

**Instituto Politécnico de Beja**  
**Escola Superior Agrária de Beja**  
**Mestrado de Engenharia do Ambiente**

**Avaliação de risco ambiental de fitofármacos em solos  
agrícolas da zona de influência do EFMA (Empreendimento  
de Fins Múltiplos do Alqueva)**

**Inês Silva Martins**

**Beja**

**2020**



**Instituto Politécnico de Beja**  
**Escola Superior Agrária de Beja**  
**Mestrado de Engenharia do Ambiente**

**Avaliação de risco ambiental de fitofármacos em solos  
agrícolas da zona de influência do EFMA (Empreendimento  
de Fins Múltiplos do Alqueva)**

**Inês Silva Martins**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Beja para  
cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia do Ambiente

**Orientadora:** Doutora Patrícia Alexandra Dias Brito Palma

**Coorientadora:** Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga

**Beja**

**2020**



*Aos meus Pais*



## **AGRADECIMENTOS**

À professora Doutora Patrícia Palma, orientadora deste estudo, pela disponibilidade, orientação, ensinamentos e apoio demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

À professora Doutora Paula Alvarenga, coorientadora deste estudo, pela disponibilidade e apoio demonstrado no decurso deste trabalho.

As minhas colegas, Adriana Catarino e Clarisse Mourinha, que me acompanharam nesta etapa, pela ajuda prestada.

A todos os professores do Mestrado em Engenharia do Ambiente, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao projeto FitoFarmGest (PDR2020-101-030926).

Especialmente aos meus pais, pelo amor, amizade, apoio, incentivo e motivação ao longo da minha vida, particularmente importantes no alcance deste objetivo. Muito obrigada.

A todos o meu enorme agradecimento!





## RESUMO

Os produtos fitofarmacêuticos são produtos naturais ou obtidos a partir de síntese, destinados a proteger as plantas de doenças, pragas ou infestantes, mantendo-as saudáveis para que estas possam exprimir todo o seu potencial produtivo, tanto no que se refere à quantidade como no que respeita à qualidade dos produtos agrícolas. Com este estudo, pretendeu-se caracterizar os solos agrícolas na zona de influência do Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva (EFMA), subsistema Ardila, aproveitamento hidroagrícola Brinches-Enxoé, a avaliação da dinâmica e o risco ambiental dos principais fitofármacos em solos com três tipos de culturas: luzerna, pastagem e olival. Os solos analisados apresentaram uma textura média a pesada, pH ligeiramente alcalino, e uma condutividade elétrica baixa, típica de solos não salinos a pouco salinos. Os teores de matéria orgânica variaram entre valores muito baixos, no olival 2, baixos, no olival 1 e na luzerna, tendo sido superiores a 2% (teores médios) no solo da pastagem. Os teores de azoto foram igualmente baixos, típicos de regiões áridas, com valores superiores no solo da pastagem, e teores altos, a muito altos, para o fósforo e potássio extraíveis. Com raras exceções, a camada arável do solo é a mais enriquecida em matéria orgânica e macronutrientes principais, sendo essa diferença mais acentuada no solo de pastagem. Nas parcelas não mobilizadas, a atividade enzimática da  $\beta$ -glucosidase e da fosfatase ácida foram superiores na camada arável, enquanto nas parcelas mobilizadas, a atividade enzimática é mais homogênea nas duas camadas. A urease registou valores superiores na luzerna e pastagem. Relativamente aos bioensaios, o *Vibrio fischeri* identificou uma maior toxicidade no final do período de rega, relativamente ao início, e a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* identificou uma maior resposta tóxica nas amostras de solo da camada arável, relativamente ao subsolo. Dos 44 compostos analisados, 12 foram detetados em amostras de solo no início do período de rega, aumentando para 15 no final. O metolaclo (herbicida) foi encontrado em todas as amostras analisadas, o terbutrino (triazida) em 94% e o tiametoxame (neonicotinóide) em 75% das amostras. Os resultados da avaliação de risco evidenciaram que, de uma maneira geral, os fitofármacos se encontravam em concentrações abaixo das concentrações de efeito não observado (CENO), sem risco ecotoxicológico para os macroinvertebrados terrestres. Porém, esse risco resultou superior para o herbicida isoproturão, seguido do inseticida metiocarbo, e do imidaclopride, todos em solos de olivais.

## **Palavras Chave**

Solos, dinâmica de fitofármacos em solos agrícolas, avaliação de risco ambiental de fitofármacos, sustentabilidade de práticas agrícolas, albufeira de Alqueva.

## ABSTRACT

Phytopharmaceuticals products, natural or obtained products via synthesis, are designed to protect plants from diseases, pests or weeds, keeping them healthy so they can express all of their productive potential, both in quantity as in quality of agricultural products. The propose of this study was to characterize agricultural soils in the influence area of the Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva (EFMA), Ardila subsystem, Brinches-Enxoé hydro-agricultural exploitation, and also the evaluation of the dynamics and the environmental risk of the main phytopharmaceuticals in soils with three types of crops: lucerne, pasture and olive grove. The analyzed soils revealed a medium to heavy texture, a slightly alkaline pH and a low electrical conductivity, typical of non-saline to slightly saline soils. The organic matter contents varied between very low values in olive grove 2 and low in olive grove 1 and lucerne, having been higher than 2% (average contents) in the pasture soil. The nitrogen levels were also low, typical of arid regions, with higher values in the pasture soil, and high to very high levels for extractable phosphorus and potassium. With rare exceptions, the arable layer of the soil is the most enriched in organic matter and main macronutrients, being this difference more accentuated in the pasture soil. In the non-mobilized plots, the enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase and acid phosphatase were higher in the arable layer, while in the mobilized plots the enzymatic activity is more homogeneous in both layers. Urease registered higher values in lucerne and pasture. Regarding bioassays, *Vibrio fischeri* identified a higher toxicity at the end of the irrigation period compared to the beginning, and the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* identified a higher toxic response in soil samples from the arable layer when compared to the subsoil. Of the 44 compounds analyzed, 12 were detected in soil samples at the beginning of the irrigation period, number that increased to 15 at the end. Metolachlor (herbicide) was found in all samples analyzed, terbutrino (triazide) in 94% and thiamethoxam (neonicotinoid) in 75% of samples. The results of the risk assessment showed that, in general, phytopharmaceuticals were found in concentrations below the concentrations of unobserved effect (CENO), with no ecotoxicological risk for terrestrial macroinvertebrates. However, this risk was higher for the herbicide isoproturon, followed by the insecticide metiocarb and imidacloprid, all in olive grove soils.

**Keywords**

Soils, dynamics of phytopharmaceuticals in agricultural soils, environmental risk assessment of phytopharmaceuticals, sustainability of agricultural practices, Alqueva reservoir.

## SIGLAS E ACRÓNIMOS

APA	Agência Portuguesa do Ambiente
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CAP	Concentração Ambiental do Poluente
CE	Condutividade Elétrica
CENO	Concentração de efeitos não tóxicos observados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DT <sub>50</sub>	Tempo de meia vida
EC <sub>20</sub>	Concentração que promove efeito tóxico em 20% da população exposta
EC <sub>50</sub>	Concentração que promove efeito tóxico em 50% da população exposta
ECC	European Community Commision
EFMA	Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva
<i>et al.</i> ,	e colaboradores
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FI	Fator de Incerteza
IUSS	União Internacional de Ciências do Solo
K	Potássio
K <sub>d</sub>	Coeficiente de partição solo:água
K <sub>oc</sub>	Coeficiente de partição carbono orgânico- água
K <sub>ow</sub>	Coeficiente de partição octanol-água
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
MO	Matéria Orgânica
N	Azoto
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ião de amónio
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ião de nitrato
P	Fósforo
PNG	<i>p</i> -nitrofenil-β-d-glucopiranosídeo
RQ	Risco Ambiental
TPF	Trifenilformazan
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
UE	União Europeia

# ÍNDICE GERAL

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Considerações iniciais.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Objetivo.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Estrutura da dissertação .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Caracterização dos solos em Portugal .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Agricultura em Portugal Continental.....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Agricultura no Alentejo .....	7
<b>2.3. Degradação de solos agrícolas .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Avaliação da qualidade do Solo.....</b>	<b>11</b>
2.4.1. Parâmetros de avaliação física .....	11
2.4.2. Parâmetros de avaliação química.....	12
2.4.3. Parâmetros de avaliação bioquímica.....	17
2.4.4. Indicadores ecotoxicológicos.....	20
<b>2.5. Fitofármacos: classes e utilização.....</b>	<b>22</b>
2.5.1. Riscos associados à utilização de fitofármacos .....	23
2.5.2. Características dos fitofármacos que influenciam a sua toxicidade .....	24
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Área de estudo.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Amostragem .....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Recolha e preparação das amostras .....	30
3.2.2. Amostras de solos .....	32
<b>3.3. Metodologias analíticas .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Ensaio Enzimáticos .....</b>	<b>34</b>
3.4.1. $\beta$ -Glucosidase .....	34
3.4.2. Fosfatase ácida.....	34
3.4.3. Urease .....	34
3.4.4. Desidrogenase.....	35

<b>3.5. Ensaios ecotoxicológicos .....</b>	<b>36</b>
3.5.1. Ensaio de inibição de luminescência com a bactéria <i>V. fischeri</i> .....	36
3.5.2. Ensaio com o organismo <i>P. subcapitata</i> .....	37
<b>3.6. Quantificação de fitofármacos no solo .....</b>	<b>39</b>
<b>3.7. Avaliação de Risco Ambiental.....</b>	<b>40</b>
<b>3.8. Tratamento estatístico dos resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Caraterização físico-química dos solos.....</b>	<b>43</b>
4.1.1. Textura .....	43
4.1.2. pH.....	44
4.1.3. Condutividade elétrica.....	46
4.1.4. Matéria orgânica.....	48
4.1.5. Azoto .....	50
4.1.6. Fósforo .....	52
4.1.7. Potássio.....	53
<b>4.2. Caracterização da atividade enzimática .....</b>	<b>54</b>
4.2.1. $\beta$ -glucosidase.....	54
4.2.2. Fosfatases ácidas .....	56
4.2.3. Urease.....	58
4.2.4. Desidrogenases.....	59
<b>4.3. Caracterização ecotoxicológica .....</b>	<b>60</b>
4.3.1. Ensaio de inibição de luminescência com a bactéria <i>V. fischeri</i> .....	60
4.3.2. Ensaio com a microalga verde <i>P. subcapitata</i> .....	62
<b>4.4. Dinâmica e risco ecotoxicológico dos fitofármacos .....</b>	<b>65</b>
<b>5. Considerações Finais.....</b>	<b>73</b>
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>75</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Solos de Portugal continental, de acordo com a classificação da FAO (adaptado: <a href="https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/30470/1/TM_igotul009646.pdf">https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/30470/1/TM_igotul009646.pdf</a> ). ...	<b>6</b>
<b>Figura 2-</b> Diagrama triangular das classes de textura dos solos (adaptado de: Lemos & Santos, 1996). .....	<b>12</b>
<b>Figura 3-</b> Processos de transporte e transformação nos vários compartimentos ambientais (adaptado de: Calamari & Vighi, 1990). .....	<b>25</b>
<b>Figura 4-</b> A- Parcela de luzerna; B- Parcela de pastagem; C- Parcela de olival 1; D- Parcela de olival 2. ....	<b>29</b>
<b>Figura 5-</b> Campanha de rega 2019 (adaptado de: <a href="https://www.edia.pt/pt/o-que-e-o-alqueva/ocupacao-cultural/">https://www.edia.pt/pt/o-que-e-o-alqueva/ocupacao-cultural/</a> ). .....	<b>29</b>
<b>Figura 6-</b> Colheita de solos nas parcelas utilizadas no estudo. ....	<b>30</b>
<b>Figura 7-</b> Amostras de solos a secar (A); Crivo de malha de 2 mm (B). ....	<b>32</b>
<b>Figura 8-</b> Equipamento LUMISTox (LANGE). ....	<b>37</b>
<b>Figura 9-</b> Cultura de microalga verde <i>P. subcapitata</i> (A); Amostras de lixiviados dos solos no agitador durante as 72h do ensaio (B). ....	<b>38</b>
<b>Figura 10-</b> Variação do parâmetro pH (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela. As linhas a preto representam o intervalo de pH ótimo para cada uma das culturas (Santos, 2015). .....	<b>45</b>
<b>Figura 11-</b> Variação da condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). As linhas a preto representam o intervalo de CE ótima para cada uma das culturas (Santos, 2015). .....	<b>47</b>
<b>Figura 12-</b> Variação do teor em matéria orgânica (% m/m) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). ....	<b>49</b>

**Figura 13-** Variação do teor em azoto Kjeldahl (% m/m) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). .....51

**Figura 14-** Variação do teor em fósforo extraível (mg/Kg) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas tem haver com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). .....52

**Figura 15-** Variação do teor em potássio extraível (mg/Kg<sup>-1</sup>) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). .....53

**Figura 16-** Variação do parâmetro β-glucosidase (μmol p-nitrofenol g<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). .....55

**Figura 17-** Variação do parâmetro fosfatases ácidas (μmol p-nitrofenol g<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>) (média± desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). .....57

**Figura 18-** Variação do parâmetro ureases (μmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup>- N g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) (média± desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). .....58

**Figura 19-** Variação do parâmetro desidrogenase (μg TPF. g) (média± desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha

de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).....	59
<b>Figura 20-</b> Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga <i>P. subcapitata</i> exposta durante três dias aos lixiviados, e respetivas diluições, de solo de luzerna (m dia $\pm$ DP; n=6).....	63
<b>Figura 21-</b> Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga <i>P. subcapitata</i> exposta durante três dias aos lixiviados, e respetivas diluições, de solo de pastagem (m dia $\pm$ DP; n=6). ....	63
<b>Figura 22-</b> Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga <i>P. subcapitata</i> exposta durante três dias aos lixiviados, e respetivas diluições, de solo de olival 1 (m dia $\pm$ DP; n=6). ....	64
<b>Figura 23-</b> Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga <i>P. subcapitata</i> exposta durante três dias aos lixiviados, e respetivas diluições, de solo de olival 2 (m dia $\pm$ DP; n=6). ....	64
<b>Figura 24-</b> Concentrações obtidas para os fitofármacos detetados (ng/g) nas diferentes parcelas avaliadas, em T1 (gráfico superior), e T2 (gráfico inferior).....	69

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Classificação dos solos quanto ao pH (H <sub>2</sub> O) (Santos,2015).....	<b>13</b>
<b>Tabela 2-</b> Classificação dos solos quanto à condutividade elétrica (Varennnes, 2003)...14	
<b>Tabela 3-</b> Classificação dos solos quanto ao teor em matéria orgânica (Santos, 2015).15	
<b>Tabela 4-</b> Classificação dos solos quanto aos teores de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e K <sub>2</sub> O assimiláveis (Santos, 2015).....	<b>16</b>
<b>Tabela 5-</b> Classificação de produtos fitofarmacêuticos de acordo com a sua função (adaptado de Simões, 2005). ....	<b>22</b>
<b>Tabela 6-</b> Itinerário técnico das culturas. ....	<b>31</b>
<b>Tabela 7-</b> Fatores de incerteza.....	<b>41</b>
<b>Tabela 8-</b> Classificação da classe textural dos solos das quatro parcelas agrícolas avaliadas. ....	<b>43</b>
<b>Tabela 9-</b> Valores de EC <sub>20</sub> (media ±desvio padrão) obtido no bioensaio com a bactéria <i>V. fischeri</i> quando exposta aos lixiviados dos solos em análise.....	<b>61</b>
<b>Tabela 10-</b> Propriedades dos diferentes fitofármacos analisados: tempo de meia-vida no solo (DT <sub>50</sub> ), coeficiente de partição octanol/água (log Kow), índice de Gus a pH 7 e 20°C, e concentrações tóxicas para invertebrados do solo (PPDB, 2007). ....	<b>67</b>
<b>Tabela 11-</b> Classificação do risco dos diferentes fitofármacos analisados em T1. ....	<b>71</b>
<b>Tabela 12-</b> Classificação do risco dos diferentes fitofármacos analisados em T2. ....	<b>72</b>

## 1. Introdução

### 1.1.Considerações iniciais

O solo é considerado um recurso não renovável, pois demora vários anos para que se forme uma camada de solo natural, através do processo da pedogénese. Diversos estudos indicam que o solo tem uma taxa de formação entre 0,1 mm/ano e 1 mm/ano. Por este facto, o índice de renovação do solo é bastante menor do que o da sua destruição, geralmente provocada pela ação humana (Abreu *et al.*, 2007).

O solo fornece às plantas não só o suporte físico para a sua fixação, mas também o meio onde se desenvolvem e onde, através deste, se efetuam as trocas gasosas e a assimilação dos nutrientes necessários ao seu crescimento (Cerqueira, 2001).

O solo exerce também uma função habitat e de reserva genética para um elevado número de microrganismos, os quais estão envolvidos na maioria dos ciclos biogeoquímicos, nomeadamente nos ciclos de carbono, azoto e fósforo. De entre as atividades dos microrganismos do solo podemos referir: a degradação da matéria orgânica (MO), levando à produção de húmus; mineralização de compostos de azoto, enxofre e fósforo orgânico, aumento da disponibilidade de nutrientes como o fósforo, o manganês, ferro, zinco e cobre; melhoria da estrutura do solo; associações micorrízicas; aumento da atividade respiratória da rizosfera, fixação biológica de azoto por bactérias simbióticas de leguminosas e não leguminosas; melhoria do crescimento das plantas; produção de fitohormonas; incompatibilidade contra agentes patogénicos; maior assimilação de nutrientes; biodegradação de pesticidas sintéticos e outros compostos tóxicos e maior tolerância à secura (Ferreira *et al.*, 2009).

A utilização de fitofármacos desempenha um papel importante na qualidade das culturas agrícolas, proporcionando benefícios para o aumento da produção, tais como a redução de infestantes, pragas ou doenças. No entanto, pode induzir o desenvolvimento de efeitos nefastos em solos agrícolas, águas superficiais e subterrâneas e, consequentemente, nos ecossistemas. O seu uso maciço tem promovido o aumento da resistência a pragas e a contaminação dos diversos compartimentos abióticos, resultando num risco potencial para as culturas, saúde das populações e para o ambiente (FitoFarmGest, 2018).

A análise de fitofármacos nos vários compartimentos abióticos e nos produtos para consumo humano é, atualmente, uma área de extrema importância devido a:

- (i) aumento de quantidades de fitofármacos detetados nos compartimentos abióticos;
- (ii) propriedades químicas de fitofármacos, tais como, persistência ambiental, elevada lixiviação, elevada bioacumulação e bioamplificação na cadeia trófica, o que promove um aumento do seu risco toxicológico;
- (iii) estabelecimento de diretrizes rigorosas por parte da Comissão Europeia para minimizar o impacto desta classe de compostos (Diretiva 2013/39/CE).

Assim, no âmbito de uma melhoria da eficiência dos recursos na produção agrícola, nomeadamente no uso e qualidade do solo, é imprescindível que sejam realizados estudos com o objetivo de compreender a dinâmica dos fitofármacos nos vários compartimentos abióticos (solo, água) e bióticos (plantas), e avaliar os impactes negativos (se existentes) para os recursos hídricos, o solo, a cultura e o consumidor, promovendo, desta forma, o incremento da gestão sustentável de fitofármacos, com o correspondente aumento da eficiência do uso e da qualidade da água, e das culturas agrícolas. Tal esforço é imprescindível para garantir que o sector agrícola permaneça ambiental, económica e socialmente sustentável, tanto no presente como no futuro (FitoFarmGest, 2018).

A importância do Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva (EFMA), na região do Alentejo (Sul de Portugal), possibilitou o aumento da área regada e a intensificação das culturas de regadio, alterando as práticas agrícolas, e promovendo o aumento de culturas como o olival e a vinha (Palma, *et al.*, 2019). São 120000 hectares de regadio, implementados numa região onde os solos têm elevada aptidão para esta prática agrícola, o número de horas de sol é superior à média europeia, e o clima, são fatores que, aliados à disponibilidade de água, oferecem à região indiscutíveis vantagens competitivas (EDIA, 2017).

Esta mudança do uso da terra foi acompanhada pela intensificação de utilização de fatores de produção (fitofármacos e adubos). A utilização de fitofármacos e adubos desempenha um papel importante na qualidade das culturas agrícolas, proporcionando benefícios para o aumento da produtividade, redução de infestantes, pragas ou doenças (Palma, *et al.*, 2019). No entanto, o uso não controlado de fatores de produção pode diminuir a qualidade dos solos agrícolas, das águas superficiais e subterrâneas, resultando num risco potencial para os ecossistemas e para a saúde das populações (Palma, *et al.*, 2019).

Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos no âmbito da quantificação e avaliação do risco de substâncias perigosas, como fitofármacos, na massa de água da Albufeira de

Alqueva (coluna de água e sedimentos), (Palma et al., 2009; Palma et al., 2014b, 2015a, b), no entanto ainda não foram desenvolvidos estudos sobre a dinâmica e risco ambiental de fitofármacos em solos agrícolas da zona de influência do EFMA.

## **1.2. Objetivo**

O trabalho desenvolvido nesta dissertação tem como principais objetivos:

- A avaliação das propriedades físicas, químicas e biológicas de solos agrícolas da zona de influência do Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva (EFMA);
- A avaliação da dinâmica dos principais fitofármacos em solos agrícolas da zona de influência do EFMA;
- A avaliação do risco ambiental dos principais fitofármacos identificados;
- O delineamento de medidas, ao nível das práticas agrícolas, para o uso mais sustentável de fitofármacos.

## **1.3. Estrutura da dissertação**

De modo a cumprir todos os objetivos propostos, elaborou-se a presente dissertação que é composta por seis capítulos.

No primeiro capítulo realizou-se uma introdução geral à utilização de fitofármacos na agricultura na zona de influência do EFMA, e definiram-se os objetivos a alcançar.

No segundo capítulo é apresentada uma breve descrição sobre a caracterização dos solos em Portugal e sobre a agricultura em Portugal e no Alentejo. É abordada a temática da degradação de solos agrícolas, caracterização dos fitofármacos (propriedades que influenciam a sua toxicidade) e, ainda, os parâmetros para a avaliação da qualidade de solo agrícola.

O terceiro capítulo refere-se aos materiais e métodos. Neste capítulo foi descrita a área em estudo, como foi realizada a amostragem, a preparação e conservação das amostras e as metodologias utilizadas na avaliação da qualidade dos solos (caraterização físico-química, ensaios ecotoxicológicos, ensaios enzimáticos, quantificação de pesticidas no solo, e avaliação de risco ambiental).

No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios físico-químicos, da caracterização da atividade enzimática, dos ensaios ecotoxicológicos, da caracterização dos pesticidas e a avaliação de risco ambiental nos solos dos diferentes locais de amostragem.

O quinto capítulo apresenta as considerações finais e as limitações do presente estudo.



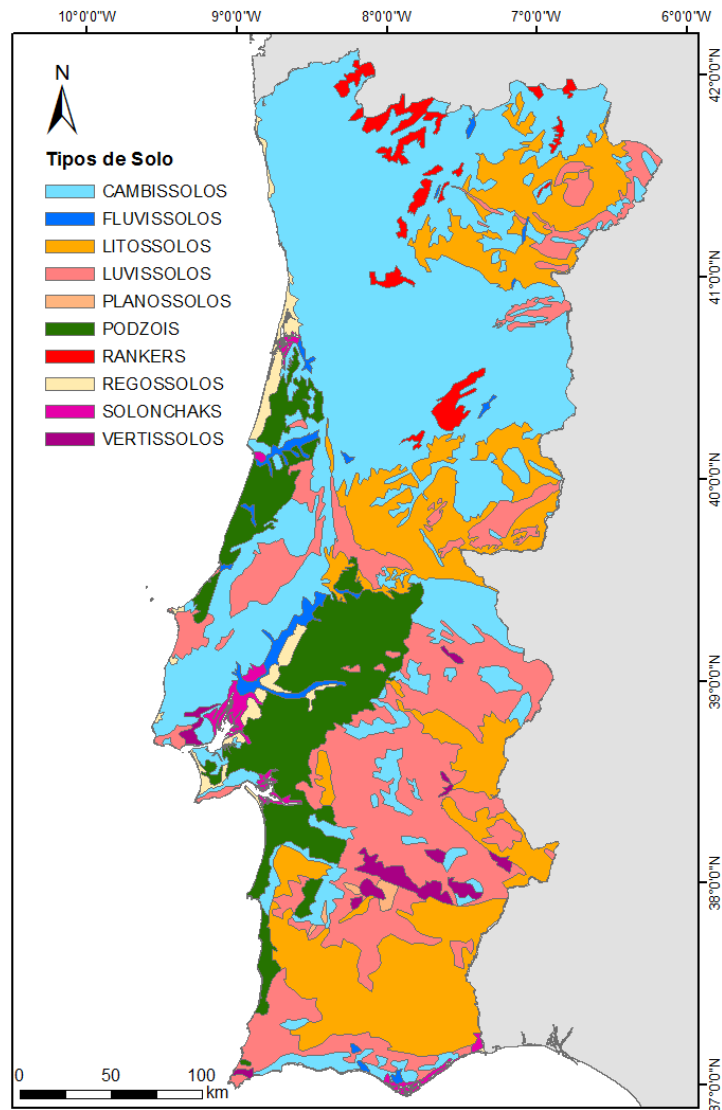
Por último, as referências bibliográficas utilizadas no desenvolvimento desta dissertação.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Caracterização dos solos em Portugal

Os solos presentes em Portugal Continental são em geral jovens, pouco desenvolvidos, com características que, em certos casos, refletem predominantemente as rochas subjacentes, e o clima (Ferreira, 2000).

Em Portugal, os solos são maioritariamente ácidos, exceto os desenvolvidos sobre terrenos com componente carbonatada ou rochas graníticas predominantemente básicas (Ferreira, 2000). Na Figura 1 está representada a distribuição geográfica do tipo de solos em Portugal Continental.



**Figura 1-** Solos de Portugal continental, de acordo com a classificação da FAO (adaptado: [https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/30470/1/TM\\_igotul009646.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/30470/1/TM_igotul009646.pdf)).

Os solos predominantes em Portugal são os Cambissolos, que se caracterizam como solos jovens, moderadamente desenvolvidos sobre uma rocha parental pouco a moderadamente meteorizada, não apresentando quantidades apreciáveis de argila, MO e compostos de alumínio ou ferro (Ferreira, 2000).

O segundo tipo de solo mais representado em Portugal, nomeadamente no Alentejo, são os Litossolos. Estes solos, são solos incipientes (solos em formação, sem horizontes genéticos claramente diferenciados, praticamente reduzidos ao material originário, como ordem são definidos por ausência de características que definem um perfil). São caracterizados por serem pouco evoluídos, formados a partir de rochas não calcárias; pequena espessura efetiva, frequentemente pobres sob o ponto de vista químico, baixo teor em MO, expansibilidade baixa ou nula, permeabilidade rápida e capacidade de campo mediana. Derivam de rochas consolidadas e estão sujeitos a erosão forte (Ferreira, 2000).

## **2.2. Agricultura em Portugal Continental**

Em Portugal Continental, cerca de 80% do território encontra-se ligado à atividade agrícola ou florestal, e a maioria dos solos (66%) são de fraca qualidade agrícola (Moreira, 2017).

Desde sempre que a agricultura é considerada uma atividade do setor primário, com características tradicionais e poucos avanços tecnológicos. Porém, esta situação tem vindo a sofrer alterações ao longo dos últimos anos, com a adoção e o investimento em novas tecnologias, nomeadamente na rega, na mobilização de solos, no combate a pragas e doenças e na fertilização. Estas alterações têm permitido um aumento da produtividade e uma utilização mais eficiente dos recursos, melhorando a competitividade agrícola (Pinto *et al.*, 2017).

### **2.2.1. Agricultura no Alentejo**

A paisagem do Alentejo é caracterizada pelos montados, inteiramente construída devido à história agrária e ao trabalho humano que ao longo dos séculos foram alterando o ecossistema mediterrâneo original, na sua estrutura e biodiversidade, num sistema de uso agro-silvo-pastoril extensivo, associado à grande exploração fundiária (Pimenta, 2014).

O montado ocupa solos de menor potencial produtivo. Cerca de 70% da sua área corresponde a solos Litólicos, Litossolos e Solos Argiluvitados delgados. Estes solos apresentam uma baixa fertilidade, devido à natureza da rocha mãe, em que dominam os granitos, e seus derivados, e os xistos, o que confere a estes solos uma baixa capacidade de troca catiónica e acidez (Carvalho, 2014).

Tradicionalmente, a agricultura no Alentejo era desenvolvida de forma extensiva, em sistemas de sequeiro, tendo baixos rendimentos por hectare. Predominavam as áreas de cereal, pousio, olival e montado. Atualmente, tem vindo a modificar-se em alguns locais para uma agricultura de regadio, que permitiu uma ampliação dos sistemas agrícolas pela viabilização de algumas culturas de sequeiro e pela introdução de novas culturas de regadio (Grupo de Projeto Alqueva Agrícola, 2004). A agricultura de sequeiro tem mais de 50% da área de culturas arvenses, que foi convertida em pastagens permanentes, na sua maioria pobres, de fraca qualidade e produtividade (Marques & Carvalho, 2017).

A segurança do abastecimento regular de água veio permitir a introdução de culturas permanentes no Alentejo, como o olival, a vinha e o amendoal. Também foram introduzidas culturas com elevada dependência do regadio, como o milho (Instituto Nacional de Estatística, 2019).

### 2.3.Degradação de solos agrícolas

Em Portugal, os principais riscos da degradação dos solos são a erosão e a perda de MO (Alexandre, 2015), e, em solos agrícolas de regadio, a salinização e a contaminação por substâncias perigosas. Durante o processo de erosão há um arrastamento seletivo de elementos, argila e MO. Assim, não só se verifica uma perda quantitativa do solo, mas, principalmente, uma diminuição da qualidade do mesmo (Calouro *et al.*, 1999).

As reduções da MO têm como consequência a incapacidade de o solo resistir à deterioração provocada pela erosão e a compactação. Uma das causas para a perda de MO são as práticas intensivas da agricultura sobre a camada arável do solo, que aceleram a sua mineralização, com consequente perda de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para a atmosfera e o aumento da concentração de iões de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) suscetíveis de serem lixiviados (Martins & Fernandes, 2017). A MO representa usualmente 1 a 6% da massa total da camada arável de um solo mineral, e vai influenciar as suas propriedades físicas e químicas, sendo determinante para a qualidade e resiliência do solo (Varennnes, 2003).

H ni (1994) sustenta que, a presença de MO num solo é benéfica no combate à erosão pois, ao promover a agregação das partículas constituintes do solo, gera um menor arrastamento das mesmas. Este autor refere ainda o aumento da capacidade de troca catiónica do solo devido ao aumento do teor de MO. Deste modo, a presença deste constituinte no solo deveria ser propícia à imobilização de alguns contaminantes, nomeadamente, quando estes apresentam carga positiva.

A salinização é um processo de degradação que, geralmente, leva à desertificação das terras (Martins & Fernandes, 2017), o que resulta num aumento da concentração de sais solúveis, nomeadamente de sódio ( $\text{Na}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), no solo e na solução do solo, para níveis prejudiciais à planta. As causas mais comuns são a utilização de solos impróprios ou mal adaptados para a prática do regadio (com baixa permeabilidade e sem sistemas de drenagem), a rega com águas de má qualidade (ricas em sais solúveis), uma má prática de rega (dotações de rega inadequadas, distribuição irregular da água, subida da toalha freática), o uso intensivo de fertilizantes ou corretivos, particularmente em condições de limitada lixiviação, e o uso de águas residuais ou produtos salinos de origem industrial (Gonçalves *et al.*, 2017).

A prevenção da erosão do solo requer a utilização de um conjunto de práticas agrícolas capazes de impedir a perda da camada arável do solo, que é a mais fértil (Calouro *et al.*,

1999), nomeadamente a utilização da sementeira direta ou mobilização mínima, enrelvamento da entrelinha nas culturas permanentes, uso de rotações culturais adequadas que incluam espécies que mantenham o solo revestido durante a época das chuvas e o uso de uma cultura complementar forrageira de Outono- Inverno (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, s.d.).

A compactação dos solos também contribui para a sua degradação. Na compactação do solo há um aumento da massa por unidade de volume, resultando num aumento da sua densidade aparente, e numa diminuição da microporosidade relativa, o que contribui para a redução linear da porosidade total e da macroporosidade (Beutler *et al.*, 2005). Os efeitos da compactação estão diretamente relacionados com a redução significativa da produtividade das culturas, uma consequência da dificuldade de fixação das raízes. Como consequência deste mau desenvolvimento radicular, as plantas não conseguem absorver os nutrientes, o que explica a quebra na produtividade. Por outro lado, há uma redução dos espaços livres no solo, o que diminui a quantidade de oxigénio, trazendo um baixo desenvolvimento para a planta (Kleffmann, 2012).

Uma outra forma de degradação do solo resulta da sua contaminação com compostos químicos (substâncias perigosas), o que provoca efeitos tóxicos para os ecossistemas terrestres e aquáticos e para o Homem.

Os metais potencialmente tóxicos e os contaminantes emergentes, nomeadamente os fitofármacos, são dos contaminantes que maior risco representa para os ecossistemas terrestre/ aquático e para a saúde humana (WHO, 2013).

## **2.4.Avaliação da qualidade do Solo**

As propriedades físicas e químicas do solo vão influenciar o seu comportamento, as atividades que podem ser desenvolvidas nessa matriz e o modo como deve ser usado (Varennnes, 2003). O solo é a base fundamental dos sistemas de produção agrícola, as alterações nas suas propriedades afetam o crescimento vegetal, e, consequentemente o rendimento das culturas (Blainski *et al.*, 2008). As propriedades físicas estão relacionadas com a cor e temperatura, consistência, compressibilidade e compacidade, textura, estrutura, densidade aparente e porosidade (Varennnes, 2003).

Por outro lado, as propriedades químicas estão relacionadas com as concentrações dos constituintes orgânicos e inorgânicos, que determinam as características de fertilidade do solo, mas também o seu nível de contaminação (Alloway, 1995).

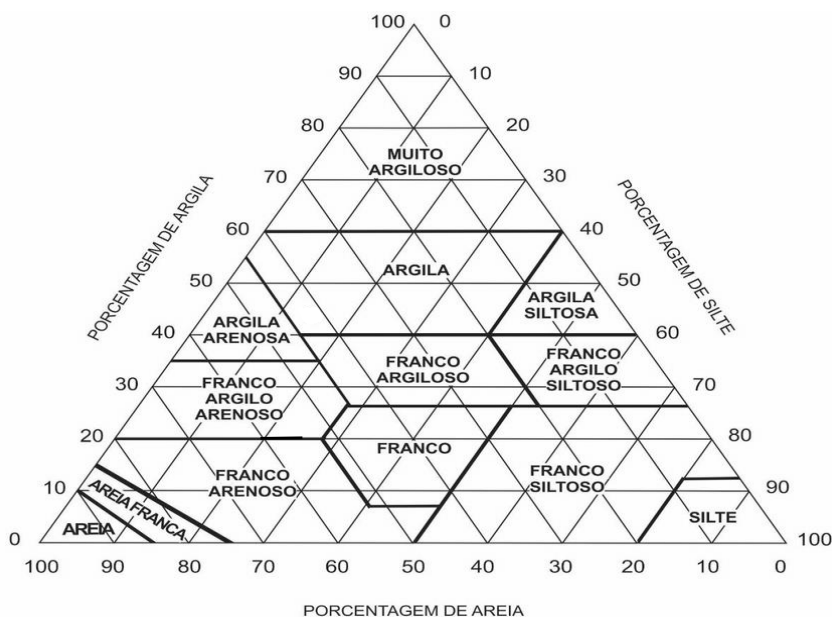
No entanto, apenas recentemente, o solo, a sua qualidade, grau de contaminação e relação com a segurança alimentar, são reconhecidos como uma questão importante por diferentes organizações: (i) a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), organizou um Simpósio Global sobre poluição do solo em 2018 (FAO GSP, 2018), e alertou para as questões da poluição do solo serem uma “realidade oculta” (Rodríguez-Eugenio *et al.*, 2018); (ii) a IUSS (União Internacional de Ciências do Solo) proclamou 2015-2024 como a Década Internacional dos Solos; (iii) enquanto a Agência Europeia do Meio Ambiente (EEA), dedicou os “Sinais 2019” à “Terra e solo na Europa” (European Environment Agency, 2019). No entanto, a União Europeia (UE) ainda carece de uma Diretiva-Quadro do Solo e, apesar de alguns esforços da Agência Portuguesa para o Ambiente (APA), que preparou um Projeto legislativo relativo Prevenção da Contaminação e Remediação dos Solo (PRoSolos, 2015), Portugal carece de legislação para avaliar a contaminação do solo.

### **2.4.1. Parâmetros de avaliação física**

A proporção de partículas de diferentes dimensões na terra fina é designada por textura do solo. Conhecendo a textura do solo este pode ser classificado de acordo com doze classes de textura (Figura 2). Se predomina a fração areia o solo tem textura grosseira, podendo ser arenoso, areno- franco ou franco- arenoso. Se predomina a argila o solo é de textura fina, podendo ser argiloso, franco- argilo- limoso, franco- argiloso, argilo- arenoso

ou argilo- limoso. Os solos de textura mediana incluem os limosos, os francos, os francos- limosos e os franco-argilo- arenoso (Varenes, 2003).

Normalmente os solos de textura mais grosseira são também mais pobres em MO do que os mais ricos em argila. Porém, os solos de textura mediana são considerados os mais adequados à produção agrícola, visto terem uma capacidade de retenção de água e nutrientes superior aos de textura grosseira, e um melhor arejamento e maior fertilidade de mobilização do que os de textura fina (Varenes, 2003).



**Figura 2-** Diagrama triangular das classes de textura dos solos (Adaptado de: Lemos & Santos, 1996).

#### 2.4.2. Parâmetros de avaliação química

Os parâmetros agronômicos utilizados para aferir a qualidade de solos para fins agrícolas são principalmente parâmetros químicos, podendo a sua avaliação ser feita segundo manuais de fertilidade de solo, permitindo ajustes de alguns destes parâmetros para uma melhoria da produção agrícola. De entre os parâmetros químicos utilizados na avaliação da fertilidade de um solo temos o pH, a condutividade elétrica, o teor de MO, bem como o teor dos macronutrientes principais, azoto total, fósforo e potássio extraíveis.



#### 2.4.2.1. pH

O pH influencia fortemente a disponibilidade de nutrientes e a presença de microrganismos e plantas no solo. A maior parte das bactérias, especialmente as que participam nos ciclos biogeoquímicos e que contribuem para a disponibilização de nutrientes para as plantas, têm preferência por solos moderadamente ácidos ou alcalinos (Hanna instruments, 2018).

A maioria das plantas cresce melhor em solos ligeiramente ácidos ou ligeiramente neutros, correspondendo o intervalo ideal de valores à gama de pH entre 5,5 e 7,5. O pH do solo afeta a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas. Um solo ligeiramente ácido pode interferir com a absorção de fósforo, potássio, magnésio e cálcio, enquanto que um solo neutro pode interferir com a absorção de ferro, cobre, manganésio, boro e zinco (Hanna instruments, 2018).

Embora a acidez ou alcalinidade de um solo possa ser analisada através da sua suspensão em diferentes soluções de moderada salinidade, o mais habitual é fazer a sua determinação utilizando uma suspensão solo:água destilada de 1:2,5, permitindo a sua classificação relativamente ao pH (H<sub>2</sub>O) de acordo com Santos (2015) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Classificação dos solos quanto ao pH (H<sub>2</sub>O) (Santos,2015).

pH do solo	Designação
<4,5	Muito ácido
4,6 – 5,5	Ácido
5,6 – 6,5	Pouco ácido
6,6 – 7,5	Neutro
7,6 – 8,5	Pouco alcalino
8,6 – 9,5	Alcalino
>9,5	Muito alcalino

#### 2.4.2.2. Salinidade

A condutividade elétrica (CE) do solo, dá-nos indicação da quantidade de sais solúveis existentes (Varennnes, 2003).

A salinidade, embora mais rigorosamente devesse ser medida no extrato de saturação do solo, avalia-se de modo mais cómodo através da CE em suspensões de solo:água destilada de diferentes proporções. Por exemplo, Santos (2015) propõe a utilização de uma suspensão solo:água destilada de 1:5, enquanto Varennnes (2003) propõe a classificação do solo quanto à CE numa suspensão solo:água destilada de 1:2 (Tabela 2).

**Tabela 2-** Classificação dos solos quanto à condutividade elétrica (Varennnes, 2003).

Classificação do solo	Condutividade elétrica dS m <sup>-1</sup> a 25°C	
	No extrato saturado	No extrato 1:2
<b>Não salino</b>	0 – 2	<0,40
<b>Muito pouco salino</b>	2 – 4	0,40 – 0,80
<b>Pouco salino</b>	4 – 8	0,81 – 1,60
<b>Moderadamente salino</b>	8 – 12	1,61 – 2,40
<b>Fortemente salino</b>	12 – 16	2,41 – 3,20
<b>Muito fortemente salino</b>	>16	>3,20

### 2.4.2.3. Matéria orgânica

A designação de MO é atribuída a um vasto e heterogéneo conjunto de substâncias que, embora apresentando em comum o facto de serem produtos orgânicos, podem apresentar características acentuadamente diferentes, consoante a sua origem e o grau de transformação que tenham sofrido (Santos, 2015).

A MO do solo é formada por resíduos vegetais e animais que são decompostos por microrganismos, formando o húmus, que participa na estruturação do solo e na retenção de água (Lepsch, 2002). A análise do teor em MO é, habitualmente, feita por oxidação por via húmida, em meio ácido, através do método de Walkley-Black (Walkley & Black, 1934), permitindo a classificação do solo quanto ao teor em MO de acordo com Santos (2015) (Tabela 3).

**Tabela 3-** Classificação dos solos quanto ao teor em matéria orgânica (Santos, 2015).

Percentagem de matéria Orgânica		Classificação
Solos Ligeiros	Solos médios e pesados	
<0,5	<1,0	Muito baixo
0,6 – 1,5	1,1 – 2,0	Baixo
1,5 – 5,0	2,1 – 7,0	Médio
5,1 – 10,0	7,1 – 15,0	Alto
>10,0	>15,0	Muito alto

#### 2.4.2.4. Azoto, fósforo e potássio

O azoto, o fósforo e o potássio constituem o grupo dos chamados macronutrientes principais, isto é, os nutrientes que, de um modo geral, são necessários às plantas em maiores quantidades e que, quase sempre, é necessário aplicar aos solos sob a forma de adubos (Alvarenga, 1997).

O fósforo e potássio extraíveis, muitas vezes chamados “assimiláveis”, indicam a quantidade de fósforo e potássio que podem ser absorvidos pelas plantas, podendo os seus teores no solo ser classificados em diferentes níveis de fertilidade para esse solo, de acordo com a Tabela 4 (Santos, 2015).

**Tabela 4-** Classificação dos solos quanto aos teores de  $P_2O_5$  e  $K_2O$  assimiláveis (Santos, 2015).

Teores de $P_2O_5$ ou de $K_2O$	Apreciação
<25	Muito baixo
26 - 50	Baixo
51 - 100	Médio
101 - 200	Alto
>200	Muito alto

### 2.4.3. Parâmetros de avaliação bioquímica

Nos parâmetros de avaliação bioquímica da qualidade do solo, integra-se a medição da atividade de diferentes enzimas existentes no solo, como indicadores da sua qualidade, relacionando-as com a sua capacidade produtiva e características de fertilidade. Por outro lado, a diminuição dessa atividade enzimática pode ser atribuída a efeitos adversos da aplicação excessiva e ambientalmente não sustentável de fatores de produção. De facto, as enzimas apresentam um grande potencial como indicadores de qualidade do solo pois são sensíveis às variações provocadas por fatores ambientais e pelas práticas agrícolas (Balota *et al.*, 2004; Tejada *et al.*, 2006)

As enzimas mais frequentemente analisadas estão envolvidas nos ciclos dos principais elementos do solo, como C, N, P e S, tais como fosfatases, sulfatases, ureases e desidrogenases. Estas enzimas têm sido utilizadas para entender os processos ecológicos envolvidos na alteração da comunidade vegetal e das características físicas, químicas e biológicas do solo (Salazar *et al.*, 2011; Vasconcellos, 2012; Araújo, 2007).

Criquet *et al.* (2004) observaram uma correlação negativa entre a atividade da fosfatase ácida e a alteração da humidade relativa no solo e da temperatura. Baldrian *et al.* (2008) relataram que a atividade das fosfatases ácidas são sensíveis às alterações sazonais, indicando maior atividade no período de chuva.

Matsuoka (2006), concluiu que as enzimas  $\beta$ -glucosidase, fosfatase ácida e urease são sensíveis à mudança das práticas agrícolas podendo indicar alterações no solo. Desta forma, estudos sobre a atividade das enzimas são bons indicadores da qualidade do solo.

#### 2.4.3.1. Atividade enzimática

As enzimas do solo são resultantes de raízes das plantas, de células microbianas, de resíduos de plantas e animais e de fungos e de bactérias do solo (Yang, *et al.*, 2008), que libertam enzimas extracelulares que desempenham um papel fundamental na degradação da MO do solo, transformando-a em formas assimiláveis (Veres *et al.*, 2015). Por isso, a determinação da atividade enzimática extracelular exprime indiretamente a atividade microbiana e a sua contribuição para o ciclo dos nutrientes (Caldwell, 2005; Veres *et al.*, 2015).

A atividade enzimática pode ser influenciada pelas propriedades do solo, tais como a humidade e o teor de MO (Jordan *et al.*, 1995; Bergstrom *et al.*, 1998). Também pode ser influenciada pelas práticas agrícolas, sendo que a utilização agrícola intensiva do solo costuma reduzir a atividade enzimática, sendo que os solos com menos culturas ou com mobilizações reduzidas ou mínimas apresentam maior atividade enzimática do que aqueles que sofreram mobilizações (Ekenler & Tabatabai, 2003; Schmitz, 2003; Matsuoka, 2006; Gupta & Germida, 1988; Angers *et al.*, 1993).

Garcia *et al.*, (2002), avaliaram as alterações nas atividades das enzimas em solos após a interrupção da sua exploração agrícola, tendo concluído que as atividades de diferentes hidrólases, como as ureases, proteases, fosfatases e  $\beta$ -glucosidase, eram restabelecidas após a suspensão da atividade agrícola, o que indica o efeito negativo das práticas culturais.

A atividade enzimática do solo tem sido sugerida como potencial indicador da qualidade e da fertilidade do solo, devido à sua estreita relação com a biologia do solo, pois é de fácil medição e de rápida resposta às alterações ocorridas no solo (Dick *et al.*, 1999).

Neste sentido, diversos estudos têm apresentado as vantagens da avaliação da atividade enzimática dos solos na determinação da sua qualidade e saúde (Dick, 1994; Dick *et al.*, 1996; Bergstrom *et al.*, 1998; Bandick & Dick, 1999; Monreal & Bergstrom, 2000; Mendes & Vivaldi, 2001; Garcia *et al.*, 2002; Schmitz, 2003; Matsuoka, 2006).

A desidrogenase está relacionada com a transferência de energia oxidativa nas células dos microrganismos vivo, sendo, por isso, considerada uma potencial medida da atividade microbiana. Avalia a atividade metabólica e a atividade oxidativa dos solos (Friedel *et al.*, 1994). O mesmo não acontece com as hidrólases, que, sendo exoenzimas, podem estar ativas no solo mesmo após a morte dos microrganismos.

A  $\beta$ -glucosidase é uma enzima importante no ciclo biogeoquímico do carbono (Tabatabai, 1994). É uma enzima extracelular, que desempenha um papel importante na degradação da MO (Alvarenga, *et al.*, 2008).

A urease está envolvida no ciclo do azoto, mais precisamente na hidrólise de azoto orgânico a inorgânico (Caravaca *et al.*, 2005). Se a atividade da urease for alta, há rápida formação de amónia, que pode ser perdida por volatilização para a atmosfera. No solo, a amónia vai transformar-se no ião de amónio ( $\text{NH}_4^+$ ), que pode ser absorvido pelas plantas

ou nitrificado (conversão a  $\text{NO}_3^-$ ), correndo o risco de se perder por lixiviação. Se a atividade da urease for baixa, a produção de N-amoniaco pode ser menor que as exigências nutricionais da planta (Melo *et al.*, 2010).

As fosfatases ácidas são enzimas chave no ciclo do fósforo que catalisam as reações de hidrólise dos compostos orgânicos fosfatados, sendo referenciadas como indicadores da atividade microbiana (Cunha-Queda, 1999), pois ajudam a nutrição das plantas e microrganismos através da hidrólise de fósforo orgânico em fósforo inorgânico (Gianfreda & Rao, 2004). Tem sido uma das hidrolases utilizadas com maior frequência na previsão de alterações na qualidade de solos provocadas pelas práticas agrícolas, ou pela presença de contaminantes, constituindo, assim, um bom indicador da qualidade e da quantidade da MO no solo (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Por isso, segundo Gil-Sotres *et al.*, (2005), de uma maneira geral, quanto maior for o teor de MO presente no solo, maior será a atividade desta enzima. Segundo Alef *et al.*, (1995), a atividade da fosfatase é influenciada não só pelo pH e temperatura, mas, também, pelo teor de MO e tipo de solo.

#### 2.4.4. Indicadores ecotoxicológicos

Os efeitos das más práticas agrícolas e uso excessivo de fatores de produção, nomeadamente de fitofármacos, também podem ser aferidos por indicadores ecotoxicológicos. De facto, enquanto os parâmetros químicos permitem avaliar quais os fatores que promovem o efeito, o uso de ensaios ecotoxicológicos possibilita avaliar as causas do dano ecológico (Soares, 1989; Crane *et al.*, 2007; Wharfe *et al.*, 2007).

Zagatto & Bertoletti (2008) e Silva *et al.* (2015) defendem que os testes de ecotoxicidade são extremamente importantes para avaliar o potencial risco ambiental dos contaminantes, uma vez que, a informação fornecida pelas análises químicas não possibilita esse tipo de avaliação.

A caracterização ecotoxicológica permite identificar as margens de segurança, ou seja, a partir de que percentagem é que existe toxicidade, e quando é que as comunidades estão a ser afetadas por algum químico.

Para isso é necessário implementar bioensaios representativos de várias espécies taxonómicas (bactérias, algas, plantas, crustáceos, insetos e peixes) e dos vários grupos funcionais (decompositores, produtores primários, consumidores primários e secundários) (Palma, 2009).

Vários estudos mostram que os bioindicadores são mais sensíveis que indicadores químicos e físicos para detetar, com maior antecedência, alterações que ocorrem no solo em virtude do seu uso e manejo (Balota *et al.*, 2003; Balota *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2004; Dick, 1994; Doran, 1980; Hungria *et al.*, 2009; Lisboa *et al.*, 2012; Matsuoka *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2003; Peixoto *et al.*, 2010; Powlson *et al.*, 1987).

Os ensaios com bactérias permitem avaliar o efeito de poluentes ou amostras ambientais em propriedades bioquímicas, como a atividade enzimática (ATPase), alterações na mobilidade (*Spirillum volutans*), inibição da emissão de luz (*Vibrio fischeri*) e viabilidade celular (*Pseudomonas putida*) (Girotti *et al.*, 2008; García-Ripoll *et al.*, 2009). Por outro lado, os ensaios com algas, para além de serem utilizados na avaliação de poluentes ambientais, permitem ainda a caracterização de condições de oxigénio, luz, temperatura e de nutrientes da massa de água, através da determinação da inibição do crescimento (ex. *Pseudokirchneriella subcapitata*) (Mendonça *et al.*, 2009).



Os ensaios ecotoxicológicos têm como objetivo estudar a variação dos efeitos subletais e letais em populações de diferentes zonas geográficas, os efeitos de exposições prolongadas a baixas doses de poluentes nos ecossistemas, as interações entre poluentes e dos poluentes com variáveis ambientais, como por exemplo, a temperatura, a salinidade e pressão atmosférica (Baird, 1999; Hoffman *et al.*, 2003). Os ensaios ecotoxicológicos são, por isso, uma ferramenta imprescindível na avaliação de risco ambiental e para a saúde humana (Ohe *et al.*, 2004).

A avaliação ecotoxicológica pode incluir os ensaios de exposição aguda e/ou crónica, consoante o que se pretende analisar. A avaliação toxicológica aguda é realizada por ensaios de curta duração com parâmetros de avaliação como imobilidade, mortalidade e luminescência (Klaassen, 2001; Hoffman *et al.*, 2003). Estes ensaios são considerados, como métodos de *screening* em avaliação toxicológica (Guilhermino *et al.*, 2000; Latif & Licek, 2004). A avaliação toxicológica crónica é realizada recorrendo a ensaios que integram as várias etapas do ciclo de vida do organismo-teste. A avaliação dos efeitos é realizada recorrendo a diferentes tipos de resposta (*endpoints*), como a taxa de reprodução, crescimento, frequência de mudas e malformações embrionárias (Hoffman *et al.*, 2003).

Para Campagna *et al.* (2016), os bioensaios tornaram-se uma ferramenta importante para avaliar o potencial tóxico de substâncias químicas e, até mesmo, para avaliar os efeitos nocivos das condições ambientais adversas (pH, temperatura, oxigénio) para diferentes espécies.

## 2.5. Fitofármacos: classes e utilização

Os fitofármacos são produtos destinados a proteger as plantas e a produção agrícola, combatendo pragas e doenças. Na sua composição entra uma ou mais substâncias ativas, responsáveis pela prevenção e/ou controlo dos inimigos ou organismos nocivos para as culturas, podendo ter diferentes designações e ser classificados conforme o organismo alvo que se pretende combater (Simões, 2005) (Tabela 5).

**Tabela 5-** Classificação de produtos fitofarmacêuticos de acordo com a sua função (adaptado de Simões, 2005).

Classes	Função
<b>Fungicidas</b>	Controle de fungos que atacam plantas
<b>Herbicidas</b>	Controle de ervas classificadas como infestantes
<b>Inseticidas</b>	Controle de insetos
<b>Rodenticidas</b>	Controle de roedores
<b>Nematodocidas</b>	Controle de nemátodos
<b>Moluscicidas</b>	Controle de lesmas e caracóis
<b>Algicidas</b>	Controle de algas
<b>Bactericidas</b>	Controle de bactérias

Os fitofármacos permitem aos agricultores a expansão da produção a novas áreas geográficas, o aumento do volume de produção, o aumento do tempo de conservação dos produtos, e a melhoria geral da aparência de alguns produtos (Withford *et al.*, 2007). O uso de fitofármacos têm vários benefícios para os agricultores, especialmente económicos, uma vez que permite prevenir quebras de produção. Os fitofármacos melhoram o rendimento agrícola e a qualidade dos produtos agrícolas, diminuem as necessidades de mão-de-obra, e ajudam a garantir o fornecimento regular de uma grande

variedade de produtos agrícolas, a preços acessíveis (Gonçalves, 2008). No caso dos herbicidas, podem contribuir, ainda que de forma indireta, para reduzir a erosão dos solos, por proporcionarem uma forma de combate às infestantes em situações de mobilização reduzida, nomeadamente em sementeira direta.

Os produtos fitofarmacêuticos são também um meio importante para satisfazer as exigências fitossanitárias, possibilitando o comércio internacional de produtos agrícolas (CCE, 2006).

A proteção das culturas agrícolas contra pragas, doenças e infestantes é um problema vasto e complexo, dado que, ao intervir-se contra os inimigos das culturas, dever-se-á fazê-lo de forma a não prejudicar o equilíbrio do elevado número de organismos vivos existentes numa dada cultura que, uma vez destruído, poderá conduzir ao aparecimento de novos problemas (Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, 1990).

Os maiores consumidores europeus de fitofármacos são a França, Itália e Espanha, sendo Portugal, Países Baixos e Grécia aqueles que menor quantidade de fitofármacos utilizam. Contudo, se considerarmos a capitação de consumo por área total, a situação é bastante distinta, e os maiores consumidores de fitofármacos passam a ser os Países Baixos, Itália e Portugal. Esta situação poderá estar relacionada com a predominância de vinha, pomar e olival em Portugal (Mota, 2016).

### **2.5.1. Riscos associados à utilização de fitofármacos**

Entre as classes de fitofármacos mais aplicadas e com maiores concentrações ambientais nos solos (inseticidas, herbicidas e fungicidas), aquelas que induzem maior efeito adverso para a saúde humana são os inseticidas, seguidos pelos herbicidas (Klaassen, 2001). De facto, todos os inseticidas são substâncias neurotóxicas, atuando nos humanos em sistemas de transmissão nervosa semelhantes aos dos insetos (Costa *et al.*, 2008). Os efeitos dos pesticidas no sistema nervoso podem estar envolvidos em episódios de toxicidade aguda, induzindo convulsões como principal sintomatologia (Hayat *et al.*, 2019), ou podem contribuir para distúrbios neurodegenerativos crónicos, como a doença de Parkinson e a epilepsia (Requena *et al.*, 2018).

Os distúrbios fisiológicos humanos do sistema endócrino são outro grupo dos efeitos adversos, relacionados com a exposição prolongada a pesticidas. Os pesticidas

organoclorados são compostos altamente lipofílicos, com atividade de desregulação endócrina (Freire *et al.*, 2013). Em regiões do globo onde são observadas elevadas concentrações ambientais de compostos organoclorados, a exposição materna induz o desenvolvimento de malformações genito-urinárias congénitas (García *et al.*, 2017). Os inseticidas sintéticos neonicotinóides, usados intensivamente nos dias de hoje, são direcionados para os recetores nicotínicos de acetilcolina, sendo que, provavelmente, também apresentam a capacidade de interferir no sistema hormonal humano (Mesnage *et al.*, 2018). Por outro lado, estudos revelaram a estreita associação de exposição a fitofármacos a longo prazo e o desenvolvimento de cancro em crianças e adultos (Kumar *et al.*, 2014).

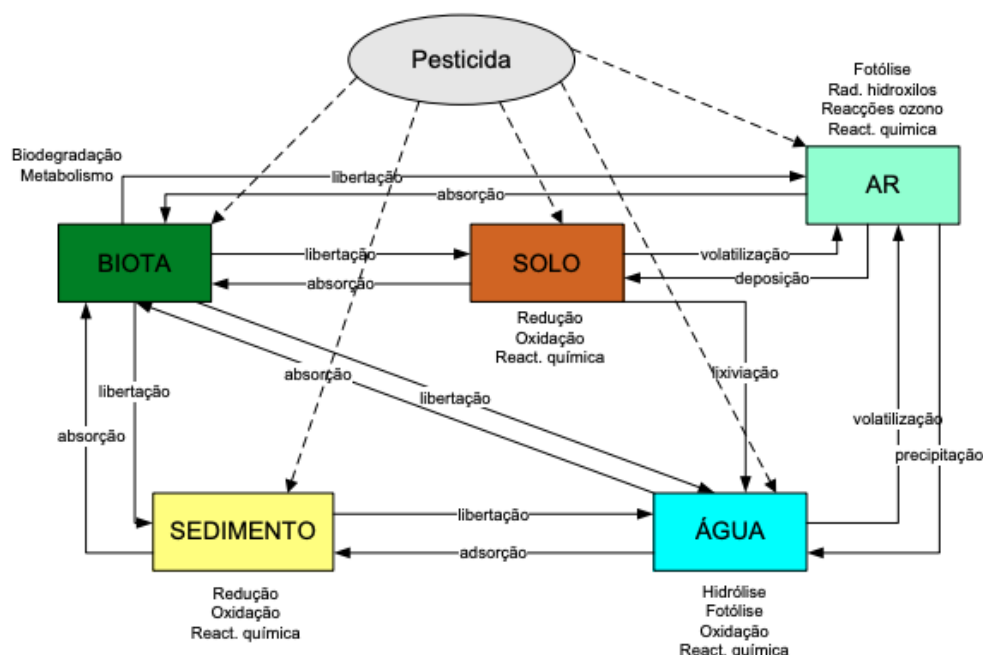
Os riscos para o ambiente consistem em efeitos adversos agudos e/ou crónicos sobre as espécies não visadas. Os efeitos agudos devem-se principalmente à elevada toxicidade de alguns produtos fitofarmacêuticos. Os efeitos crónicos, podem também afetar a condição física das populações expostas, incluem os que podem dever-se à bioacumulação e persistência das substâncias, aos efeitos irreversíveis, como a carcinogenicidade, a mutagenicidade e a genotoxicidade, ou aos efeitos adversos nos sistemas imunitários ou endócrinos dos mamíferos, peixes ou aves (COM, 2002).

#### **2.5.2. Características dos fitofármacos que influenciam a sua toxicidade**

Os fitofármacos, uma vez no solo, distribuem-se nas várias fases deste sistema, ocorrendo vários processos de dissipação, quer bióticos (degradação microbiana e absorção pelas plantas), quer abióticas (volatilização, arrastamento superficial, lixiviação, adsorção pelos colóides, degradação química por hidrólise, oxidação/redução e degradação fotoquímica à superfície) (Figura 3) (Weil & Brady, 2017).

As condições climáticas específicas, e o modo de aplicação e composição dos pesticidas, devem ser levados em consideração na avaliação do seu risco ambiental, pois estes dois fatores são os principais responsáveis pelas vias de exposição destes compostos (Silva, 2012). Os pesticidas podem ainda ser transformados em subprodutos mais tóxicos e persistentes, através de processos físicos, químicos ou biológicos (Berger, 1998). Várias propriedades intrínsecas dos fitofármacos são importantes para o aumento da sua toxicidade e do seu risco ambiental, como a estabilidade química, a elevada

lipossolubilidade (elevadas constantes de partição octanol/água,  $K_{ow}$ ), dificuldade em originar compostos inertes, e elevada taxa de lixiviação (índice de Gus).



**Figura 3-** Processos de transporte e transformação nos vários compartimentos ambientais (adaptado de: Calamari & Vighi, 1990).

### 2.5.2.1. Coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ )

O coeficiente de partição octanol-água define-se como sendo a razão entre a concentração do produto químico na fase do solvente orgânico (octanol), e a sua concentração na fase aquosa.

$$K_{ow} = \frac{\text{concentração na fase octanol}}{\text{concentração na fase aquosa}}$$

Dado que, tanto a concentração do produto químico na fase de octanol como a concentração na fase aquosa são expressas em dimensão massa/volume, o valor de  $K_{ow}$  será adimensional. Uma vez que o solvente orgânico (octanol) simula o conteúdo lipídico dos organismos, o valor do  $K_{ow}$  exprime o grau de afinidade do composto com os lípidos (Vighi, *et al.*, 1995).

Assim, este parâmetro quantifica a lipofilidade de uma substância, assumindo-se como um indicador da capacidade dessa substância para atravessar membranas biológicas, e de sofrer bioacumulação e bioamplificação na cadeia trófica. Como tal, é normalmente utilizado como uma medida da afinidade da substância para a biota, embora seja

dependente de alguns fatores biológicos que afetam a absorção e excreção das substâncias dos organismos (Vighi, *et al.*, 1995). Devido aos elevados valores de  $K_{ow}$ , utilizam-se habitualmente valores relativos ao logaritmo de  $K_{ow}$  (valores de  $\log K_{ow} > 4$ ; substâncias lipofílicas, com tendência a bioacumularem).

#### **2.5.2.2. Coeficiente de partição solo:água ( $K_d$ ) e carbono orgânico-água ( $K_{oc}$ )**

Vighi, *et al.* (1995) defendem que o coeficiente de partição carbono orgânico-água ( $K_{oc}$ ) é geralmente assumido como um indicador da afinidade de uma substância química para com o compartimento solo. O coeficiente de partição solo:água ( $K_d$ ) é definido por Linde (1994) como:

$$K_d = \frac{\text{concentração da substância no solo}}{\text{concentração da substância na água}}$$

e representa a quantidade de substância que fica adsorvida ao solo por quantidade de água.

Deste modo, os valores para o  $K_d$  podem variar bastante, porque a fração de carbono orgânico (que é um parâmetro que determina em grande parte a quantidade de pesticida que fica adsorvida ao solo), não é considerada na equação (Linde, 1994).

Então, é possível definir um novo coeficiente de partição carbono orgânico-água ( $K_{oc}$ ) do seguinte modo:

$$K_{oc} = \frac{K_d \times 100}{\% \text{ carbono orgânico}}$$

O  $K_{oc}$  é, usualmente, assumido como um índice de afinidade para o compartimento solo/sedimento (Pereira, 2003).

#### **2.5.2.3. Persistência e tempo de meia vida ( $DT_{50}$ )**

A persistência ambiental é a capacidade de uma substância permanecer na sua forma inalterada, resistindo aos vários processos de degradação ambiental. O tempo de meia vida ( $DT_{50}$ , do Inglês *Dissipation Time*) é o parâmetro que permite avaliar a persistência ambiental de um composto, e é definido por Linde (1994) como o tempo que é necessário para que metade da concentração inicial de pesticida no ambiente se degrade ou dissipe.

É um parâmetro utilizado geralmente para indicar a estabilidade de uma substância química no ambiente. A persistência depende dos vários processos de degradação a que a substância está sujeita, variando com as suas características intrínsecas e com o compartimento ambiental considerado, estando dependente das várias reações de degradação, como hidrólise, oxidação-redução, fotólise, biodegradação e volatilização, bem como da concentração em que o pesticida é aplicado (Linde, 1994; Batista, 2003).

As condições climáticas (vento, chuva, temperatura e luminosidade), o tipo de substância (fitofármaco) e formulação, o tipo de substrato e, ainda, o próprio crescimento da planta, são fatores que influenciam a taxa de dissipação do pesticida (Cerejeira, 2007a).

#### **2.5.2.4. Potencial de lixiviação - índice de lixiviação GUS**

A lixiviação pode ser definida como um processo através do qual minerais dissolvidos ou em suspensão, fertilizantes, ou outras substâncias existentes na camada superior do solo, são dissolvidas e transportadas pela água infiltrada (INETI, 2008).

O índice de lixiviação GUS (do Inglês *Groundwater Ubiquity Score*) é bastante útil na avaliação do potencial de lixiviação de uma substância química. Combinando, na sua fórmula, parâmetros relativos à mobilidade e persistência da substância no solo, o índice GUS pode ser obtido através do simples algoritmo:

$$\text{GUS} = \log_{10} (\text{DT}_{50\text{solo}}) \times (4 - \log_{10} (\text{K}_{\text{oc}}))$$

Este índice permite uma comparação genérica das substâncias químicas, não considerando o seu uso nem as suas propriedades ambientais. A sua maior vantagem é a extrema simplicidade de aplicação e interpretação (Vighi *et al.*, 1995), utilizando apenas o coeficiente de partição carbono orgânico-água ( $\text{K}_{\text{oc}}$ ) e a meia-vida no solo ( $\text{DT}_{50}$ ) dessa substância como dados de entrada (Gustafson, 1989), permitindo a seguinte interpretação do risco de lixiviação:

$\text{GUS} > 2,8$  = potencial de lixiviação elevado,

$\text{GUS} < 1,8$  = não lixivia,

$\text{GUS}$  entre 1,8 – 2,8 = potencial de lixiviação marginal.

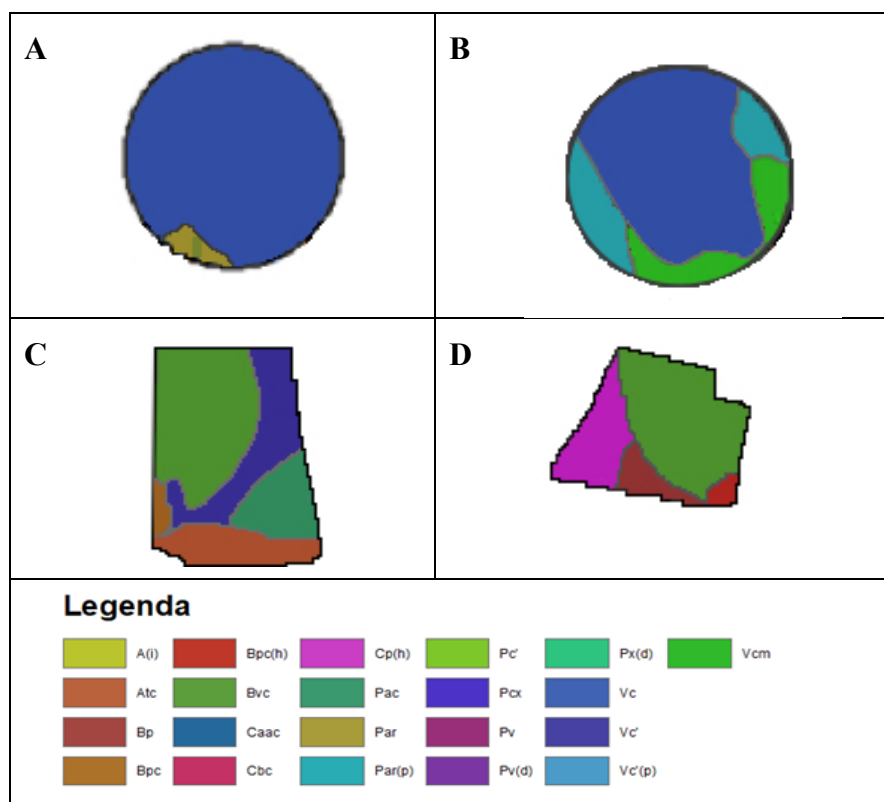
### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Área de estudo**

A área de estudo enquadra-se no subsistema Ardila, aproveitamento hidroagrícola Brinches-Enxoé, onde foram avaliadas quatro parcelas agrícolas com três tipos de culturas: luzerna (cultura anual), pastagem e olival (culturas permanentes).

Em relação aos solos das parcelas avaliadas, são caracterizados segundo a carta de solos de Portugal (SROA, 1961): (i) parcela da pastagem (Figura 4): predominantemente Vc - Solos Calcários, com manchas de Par (p) - Solos Litólicos (de textura arenosa a franco-arenosa) e Vcm - Solos Mediterrâneos, Vermelhos ou Amarelos, de Materiais Calcários, Para-Barros, de margas ou calcários margosos; (ii) parcela de luzerna (Figura 4): predominantemente Vc – solos Calcários, com manchas de Bpc - Barros Pretos, Calcários, Muito Descarbonatados, de dioritos ou gabros ou outras rochas eruptivas ou cristalofílicas básicas, associados a calcário friável; (iii) olival 1 (Figura 4): predominantemente Bvc - Barros Castanho-Avermelhados, Calcários, Muito Descarbonatados, de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas associados a calcário friável com manchas de Cp - Barros Pretos, Calcários, Não Descarbonatados, de rochas eruptivas ou cristalofílicas básicas associadas a calcário friável, ou de grés argilosos calcários ou margas; e (iv) olival 2 (Figura 4)– predominantemente Cpc - Barros Pretos, Calcários, Não Descarbonatados, de rochas eruptivas ou cristalofílicas básicas associadas a calcário friável, ou de grés argilosos calcários ou margas, com manchas de Bpc - Barros Pretos, Calcários, Muito Descarbonatados, de dioritos ou gabros ou outras rochas eruptivas ou cristalofílicas básicas, associados a calcário friável.



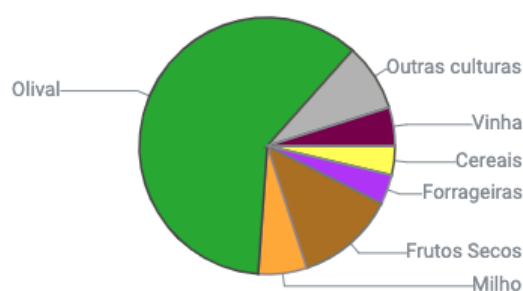


**Figura 4-** A- Parcela de luzerna; B- Parcela de pastagem; C- Parcela de olival 1; D- Parcela de olival 2.

O clima na área é do tipo mediterrâneo, com verões quentes e secos, e invernos amenos e húmidos, com chuvas concentradas (Morales, 1993).

Durante o ano de 2018, a temperatura média anual foi de 16,7°C e a precipitação totalizou 603 mm. O ano caracterizou-se por uma primavera muito chuvosa, particularmente nos meses de março (200 mm) e abril (70 mm) (Tomaz, *et al.*, 2019).

As culturas no perímetro de rega de Alqueva têm vindo a diversificar-se, sendo o olival a cultura predominante. A produção de amêndoa, milho, tomate, cebola, alho, melão e melancia, fruteiras (fruta de caroço, citrinos, uva de mesa, nozes) têm igualmente expressão nos regadios de Alqueva, a par do tradicional cultivo de vinha, cereais e forrageiras. Na Figura 5 referem-se as percentagens de cada cultura na campanha de rega de 2019 (EDIA, 2019).



**Figura 5-** Campanha de rega 2019 (adaptado de: <https://www.edia.pt/pt/o-que-e-o-alqueva/ocupacao-cultural/>).

## 3.2. Amostragem

### 3.2.1. Recolha e preparação das amostras

As amostras de solos que foram avaliadas são de parcelas com luzerna (cultura anual), pastagem e olival (culturas permanentes). A primeira recolha (T1) de solos foi realizada antes do início da campanha de rega (março e abril de 2018), enquanto que a segunda recolha (T2) dos solos foi realizada após a campanha de rega de 2018 e ajustada a cada ciclo cultural.

A amostragem de solos (Figura 6), foi realizada seguindo a metodologia descrita por Varennes (2003): por cada 5 ha de área agrícola, foi recolhida uma amostra composta, que se obteve a partir de vários pontos de amostragem marcados aleatoriamente em zigue-zague (na Tabela 6 encontram-se o itinerário técnico das culturas). Por esse motivo, o número de amostras recolhidas em cada parcela foi diferente, porque a sua dimensão era muito distinta, tendo resultado: quatro pontos de amostragem na pastagem (20 ha), cinco pontos de amostragem na luzerna (27 ha), um ponto de amostragem no olival 1 (8 ha) e três pontos de amostragem no olival 2 (14 ha) (Tabela 6).

As sub-amostras foram misturadas num balde, de onde se retiraram  $\pm 2$  kg que se levaram para o laboratório. Foram recolhidas amostras a duas profundidades de solo: (a) Camada arável: 0-20 cm; e (b) Sub-solo: 20-50 cm.



**Figura 6-** Colheita de solos nas parcelas utilizadas no estudo.

**Tabela 6-** Itinerário técnico das culturas.

	Pastagem	Luzerna	Olival 1	Olival 2
Área (ha)	20	27	8	14
N.º de amostras	4	5	1	3
Sistema de rega	Center Pivot	Center Pivot	Gota-a-gota	Gota-a-gota
Fertilização	Adubo de cobertura azotado (janeiro, julho): 80 kg/ha	Glifosato e adubo azotado 20% (aplicação de fundo).	Fertilizante N 15%, P 15%, K 15% (março): 500 kg/ha; adubo azotado com Mg, S e glicina betaína 0,5 % (fevereiro): 0,5 L/100L; Boro 11% (fevereiro): 2,5 L/ha.	Fertilizante N 23%, P 6%, K 6% (janeiro): 35 kg/ha; adubo azotado (março): 300 kg/ha; Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn (maio): 9,3 kg/ha.
Fitofármacos	-	-	Inseticida Dimetoato (maio): 2,5 cm³/L; Fungicida Trifloxistrobina (maio): 120 g/ha; Fungicida Oxiclora de Cobre (maio): 250 ml/100L.	Fungicida Oxiclora de Cobre (janeiro): 5 L/ha; Fungicida Oxiclora de Cobre (janeiro): 3,7 L/ha; Inseticida Deltametrina (maio): 175 ml/ha; Fungicida Oxiclora de Cobre (maio): 2,5 L/ha; Inseticida Deltametrina (junho): 125 ml/ha; Inseticida Fosmete (julho): 1,5 kg/ha; Inseticida Dimetoato (setembro): 1,2 L/ha;
Dotação total de rega (m³/ha)	Rega quando necessário	Rega quando necessário	3300	1700

### 3.2.2. Amostras de solos

Imediatamente após a chegada ao laboratório, uma subamostra de  $\pm 200$  g foi crivada e conservada a  $4^{\circ}\text{C}$  para a realização dos ensaios enzimáticos, e uma subamostra de  $\pm 200$  g foi retirada para conservação a  $-18^{\circ}\text{C}$ , para a quantificação de pesticidas, sendo liofilizada antes da análise.

A avaliação da toxicidade foi efetuada num extrato de solo:água ultrapura, numa razão de 1:10 (m/v), a que iremos chamar lixiviado, utilizando organismos aquáticos (ensaios indiretos). Os lixiviados foram obtidos a partir de  $\pm 50$  g de amostra seca, crivada a 2 mm e conservada no frigorífico a  $4^{\circ}\text{C}$ , para 500 ml de água ultrapura, com agitação durante 24 horas. Posteriormente, os lixiviados foram centrifugados, filtrados com filtros Whatman 40 e conservados a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Para os outros ensaios laboratoriais, as amostras foram secas ao ar, revolvidas e os agregados desfeitos ocasionalmente, sendo crivadas por crivo de malha de 2 mm após secagem (Figura 7). A crivagem permite a separação da fração fina (diâmetro  $< 2$  mm) dos elementos grosseiros. É na fração fina que se encontram os constituintes do solo mais diretamente relacionadas com a nutrição das plantas (Santos, 2015), bem como com a sua potencial poluição, razão pela qual ser nela que se vão efetuar as restantes análises ao solo.



**Figura 7-** Amostras de solos a secar (A); Crivo de malha de 2 mm (B).

### **3.3. Metodologias analíticas**

Os parâmetros químicos analisados nos solos foram: pH ( $H_2O$ , razão solo:água de 1:2,5 m/v), condutividade elétrica ( $\mu S/cm$ , razão solo:água de 1:2 m/v), matéria orgânica (% g amostra/100g amostra, Método de Walkley-Black; azoto total (Método do Kjeldahl; % NTs, g N/100g amostra); fósforo e potássio extraíveis (mg/kg; método Egner-Riehm). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados reportam à concentração em peso seco.

### 3.4. Ensaio Enzimáticos

A avaliação da qualidade dos solos também integrou a determinação da atividade enzimática de algumas enzimas do solo, nomeadamente a  $\beta$ -glucosidase, fosfatase ácida, urease e desidrogenase. Para a realização das análises, as amostras são crivadas quando chegam ao laboratório (ainda húmidas) e conservadas a 4°C até à sua análise. Para a determinação da atividade enzimática da desidrogenase é necessário a realização da análise sem que o solo seja submetido a qualquer tipo de conservação, nos dias imediatos à sua recolha.

#### 3.4.1. $\beta$ -Glucosidase

A atividade da  $\beta$ -glucosidase foi determinada segundo o método de Eivazi & Tabatabai (1977), como descrito por Alef *et al.* (1995). O método baseia-se na determinação do *p*-nitrofenol libertado após a incubação do solo com o substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (PNG) durante 1 hora a 37°C. A  $\beta$ -glucosidase foi expressa em  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Alvarenga *et al.*, 2008).

#### 3.4.2. Fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida foi determinada segundo o método de Eivazi & Tabatabai (1977), como descrito por Alef *et al.* (1995). O método baseia-se na determinação do *p*-nitrofenol libertado após a incubação do solo com o substrato *p*-nitrofenilfosfato durante 1 hora a 37°C. A fosfatase ácida foi expressa em  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Alvarenga *et al.*, 2008).

#### 3.4.3. Urease

A atividade da urease foi determinada pelo método de Kandeler & Gerber (1988) como descrito por Alef *et al.*, (1995). O método baseia-se na determinação do azoto amoniacal libertado após a incubação do solo com o substrato ureia durante 2 horas a 37°C. O teor de amónia foi determinado por espectrofotometria, a 690 nm, após reação com *dicloroisocyanide* de sódio a 0,1%. A atividade da urease foi expressa em  $\mu\text{mol NH}_4^+\text{-N g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Alvarenga *et al.*, 2008).

#### **3.4.4. Desidrogenase**

A atividade da desidrogenase foi realizada por espectrofotometria, a 546 nm, após a redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para trifenilformazan (TPF), de acordo com Tabatabai (1994). Os solos foram incubados por 16 horas a 25°C, com TTC a 0,1% (p/v) em solução tampão Tris. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Alvarenga *et al.*, 2008).

### 3.5. Ensaios ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos foram feitos num extrato de solo:água destilada de 1:10 (m/v), obtido de acordo com o protocolo DIN 38414 (1984). Os lixiviados foram preparados a partir de  $\pm 50$  g de amostra seca, crivada a 2 mm e conservada no frigorífico a 4°C, para 500 ml de água ultrapura, com agitação durante 24 horas. Posteriormente, os lixiviados foram centrifugados, filtrados e conservados a -18°C.

Para os ensaios ecotoxicológicos foram seleccionadas, de acordo com os resultados obtidos para os parâmetros químicos e enzimáticos, três amostras de solo de luzerna, duas amostras de solo de pastagem, uma amostra de solos do olival 1, e três amostras de solo do olival 2.

Nos ensaios realizados utilizaram-se duas espécies de níveis tróficos diferentes: *P. subcapitata* e *V. fischeri*.

As metodologias adotadas nos ensaios ecotoxicológicos seguiram os seguintes protocolos: ensaio de inibição de luminescência com a bactéria *V. fischeri* que foi realizado conforme o protocolo do “DR LANGE *luminescent bacteria test*” que segue o procedimento ISO11348-3, 1998 e o ensaio de inibição de crescimento com *P. subcapitata* (ISO/DIS8692, 2002).

#### 3.5.1. Ensaio de inibição de luminescência com a bactéria *V. fischeri*

A *V. fischeri* é uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa e anaeróbia facultativa. Em condições favoráveis emite luz naturalmente, necessitando para isso de oxigénio com concentrações acima de 0,5 mg/L (Amaral, 2012).

O utilizado foi realizado conforme o protocolo do “DR LANGE *luminescent bacteria test*” que segue o procedimento ISO 11348-2 (1998).

O ensaio baseia-se na medição da inibição da luminescência de uma suspensão das bactérias liofilizadas da estirpe NRRL-B-11177, quando em presença de uma série de diluições de amostra de água efluente (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100% v/v), em NaCl a 2%. Determinou-se a inibição da emissão de luz da suspensão de inóculo das bactérias quando em presença da amostra de lixiviado de solo, em comparação com um controlo não tóxico – NaCl a 2%, a uma temperatura de  $15 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O pH das amostras foi mantido



entre 6,5-7,0. Para cada amostra a bioluminescência foi lida antes e depois do período de incubação (30 minutos).

Foi realizado um teste de referência com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como controlo positivo. A sensibilidade dos organismos testados encontrava-se de acordo com o protocolo. Foram determinados os valores de  $EC_{20}$  (%) de cada amostra, considerando como parâmetro de avaliação a percentagem de inibição de luz.



**Figura 8-** Equipamento LUMISTox (LANGE).

### **3.5.2. Ensaio com o organismo *P. subcapitata***

A *P. subcapitata* é mantida em cultura no Laboratório de Toxicologia Ambiental (ESA-IPBeja), sob luz continua de lâmpadas fluorescentes (2000 lux) e condições assépticas (Figura 9). As culturas são cultivadas em meio líquido, designado por “Woods Hole MBL” (Stein, 1973).

Este ensaio tem teve como objetivo determinar o efeito dos lixiviados dos solos, na inibição do crescimento da microalga de água doce *P. subcapitata*. As microalgas são expostas, durante 72 horas aos lixiviados. Este método foi preconizado conforme o procedimento da norma ISO/DIS 8692 (2002) e da OCDE 201 (2002).

Em cada poço da microplaca foram incubados 900 µL da solução a ser testada e 100 µL de inóculo de algas. O teste compreendeu quatro concentrações da amostra a testar, cada uma com seis réplicas, e o controlo MBL (oito réplicas). A concentração inicial de inóculo de alga foi encontrava-se entre  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  n° células/ml. As placas com as amostras em análise foram colocadas num agitador de bancada durante 72 horas, a uma temperatura controlada de  $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , e com uma intensidade luminosa constante ( $60\text{-}120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , equivalente a 6000-10000 lux). Após 72 horas, determinou-se a concentração das algas, usando um método de contagem de campo visual.



**Figura 9-** Cultura de microalga verde *P. subcapitata* (A); Amostras de lixiviados dos solos no agitador durante as 72h do ensaio (B).

O crescimento das microalgas, para um intervalo de tempo específico, foi determinado utilizando a seguinte fórmula, onde:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln B_j - \ln B_i}{t_j - t_i}$$

$\mu_{i-j}$ - taxa de crescimento, no intervalo de tempo  $t_i$  para  $t_j$

$t_i$ - tempo inicial do período

$t_j$ - tempo final do período

$B_i$ - concentração (biomassa) da microalga no  $t_i$

$B_j$ - concentração (biomassa) da microalga no  $t_j$

### 3.6. Quantificação de fitofármacos no solo

A análise de fitofármacos no solo foi realizada no Instituto de *Water and Soil Quality Research Group, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA), Spanish Council for Scientific Research (CSIC)*. Os fitofármacos analisados foram os seguintes: 2,4-D, acetamipride, alacloro, atrazina, azinfos etílico, azinfos metilo, bentazona, bromoxinil, clorfenvinfos, clortolurão, clotianidina, cianazina, DEA, DIA, diazinão, diclorvos, diflufenicão, dimetoato, diurão, fentião, fentião oxon, fentião oxon sulfona, fentião oxon sulfóxido, fentião sulfona, fentião de sulfóxido, imidaclopride, irgarol, isoproturão, linuron, MOX, malatlo, MCPA, mecoprop, metiocarbo, metolacloro, molinato, pendimetalina, propanil, quinoxifeno, simazina, terbutilazina, terbutrino, tiaclopride e tiametoxame.

Foram utilizados padrões de pesticidas de elevada pureza (98-99%) da marca Sigma®. As soluções padrões foram preparadas em metanol ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) e guardadas no escuro a  $4^{\circ}\text{C}$ . As soluções padrões das misturas de todos os compostos com concentrações entre  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  e  $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  foram preparadas em solução de metanol, na diluição apropriada. Foram utilizadas misturas padrão para a preparação dos padrões de calibração, que não apresentam mais de 0,1% de metanol. A água ultra-pura para HPLC, o acetonitrilo são da marca Merck®.

A quantificação deste grupo de pesticidas foi realizada com base na técnica analítica de extração em fase sólida *on-line*, seguida de cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massa (SPE-LC-MS/MS), seguindo o protocolo descrito por Köck-Schulmeyer *et al.*, (2013).

### 3.7. Avaliação de Risco Ambiental

Para determinar o grupo de fitofármacos que promove maior impacto (maior risco ambiental) nos solos analisados, utilizou-se uma metodologia de avaliação de risco ambiental. A metodologia utilizada integra quatro fases principais:

- (1) a formulação do problema, que inclui a análise das fontes poluição, a avaliação dos processos de transferência dos fitofármacos a partir das suas fontes, e a sua distribuição no ambiente;
- (2) a caracterização da exposição que tem com objetivo a determinação da probabilidade de contato entre os fitofármacos e as populações-alvo (recetores), avaliando as principais vias de exposição, as concentrações de poluentes no meio ambiente e as características do comportamento a nível da absorção/acumulação nas plantas;
- (3) a caracterização de efeitos: caracterização dos efeitos nas populações-alvo, identificação dos organismos do ecossistema mais sensíveis aos fitofármacos. Esta etapa é baseada principalmente na avaliação biológica por bioensaios, com a determinação de *endpoints* ecotoxicológicos (e.g. CENO: concentração de efeitos não tóxicos observados, EC<sub>20</sub> - concentração que promove efeito tóxico em 20% da população exposta, EC<sub>50</sub> - concentração que promove efeito tóxico em 50% da população exposta);
- (4) a caracterização do risco ecológico: esta última fase baseia-se na integração dos resultados obtidos durante as fases anteriores. O princípio básico consiste em comparar a concentração do(s) fitofármacos nos compartimentos abióticos em estudo e nas plantas, e a intensidade do seu(s) efeito(s) tóxico sobre as várias comunidades do ecossistema (US EPA, 1998).

Em resumo, para determinar o grupo de pesticidas que promove maior impacto (maior risco ambiental) nos solos serão desenvolvidos estudos com base na metodologia de risco ambiental (RQ), que se baseia na razão entre a concentração ambiental e a concentração de efeitos não tóxicos observados (CENO) do poluente, ajustado com um fator de incerteza (FI) (Decreto Decreto-Lei nº 77/2006; ECC, 2003) (Tabela 7). Para superar a incerteza desta avaliação, associada à variabilidade de precisão inerente a erros do modelo e à falta de dados na determinação dos valores de toxicidade, os valores de CENO serão ajustados com FI para três níveis tróficos do ecossistema terrestre. Assim, irá determinar-

se o risco ecológico de cada pesticida para o ecossistema terrestre, utilizando-se o máximo das concentrações dos pesticidas quantificadas.

**Tabela 7-** Fatores de Incerteza

EC <sub>50</sub> para 3 níveis tróficos	CENO/ 100
1 CENO	CENO/100
2 CENOs para dois níveis tróficos	<CENOs /50
CENOs para, pelo menos, 3 espécies de 3 níveis tróficos	<CENOs /10
Experiências no terreno ou modelos de ecossistema	Caso a caso

### 3.8. Tratamento estatístico dos resultados

A representação gráfica dos valores (média  $\pm$  desvio padrão) de cada parâmetro químico e biológico foi efetuada a partir do programa Excel 2019.

No teste de bioluminescência com o *V. fischeri* calculou-se o EC<sub>20</sub> (concentração para a qual se verifica 20% de redução da população exposta à amostra). Para esta análise utilizou-se o software LUMISsoft4<sup>TM</sup>. Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos subletais (inibição de crescimento da microalga *P. subcapitata*) foram submetidos à análise de homogeneidade de variâncias através do teste de Kolmogorov-Smirnov (Sokal & Rohlf, 1995) e, quando possível, sujeitos a análise de variância unifatorial (One-Way ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla com o controlo pelo método de Dunnett's ( $P < 0,05$ ) (Zar, 1996). Dados que não satisfizeram os requisitos de homogeneidade de variâncias foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis on Ranks. Quando foram encontradas diferenças entre resultados, utilizou-se o teste de Dunnett's *post-hoc* para comparações múltiplas com o controlo ( $P < 0,05$ ) (Zar, 1996).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Caracterização físico-química dos solos

Os resultados obtidos para a caracterização físico-química dos solos, assim como a sua discussão, encontram-se descritos e discutidos nas secções seguintes.

#### 4.1.1. Textura

A classe textural dos solos analisados (Tabela 8) variou entre franco-argilo-arenoso, franco-argiloso, franco-argilo-limoso, franco-argiloso, argilo-arenoso e argilo-limoso, considerados solos de textura pesada (ou fina). Estas classes compreendem solos com teores mais elevados de argila e de limo, sendo mais difíceis de trabalhar (INIAP, 2006). Em termos químicos, o facto de terem um teor de argila considerável poderá conferir-lhes uma elevada capacidade de troca catiónica, o que contribuirá para a retenção de pesticidas polares ou catiónicos.

**Tabela 8-** Classificação da classe textural dos solos das quatro parcelas agrícolas avaliadas.

		Análise granulométrica (g kg <sup>-1</sup> )				Classe textural
		Areia grossa	Areia fina	Limo	Argila	
Lz	Sup.	350	297	34	318	franco-argilo-arenoso
	Sub.	346	259	65	329	franco-argilo-arenoso
	Sup.	320	268	108	304	franco-argilo-arenoso
	Sub.	308	236	68	389	argilo-arenoso
	Sup.	204	148	267	381	franco-argiloso
	Sub.	213	157	263	368	franco-argiloso
	Sup.	208	163	272	357	franco-argiloso
	Sub.	192	186	275	347	franco-argiloso
	Sup.	196	198	282	324	franco-argiloso
	Sub.	235	150	256	358	franco-argiloso
Ps	Sup.	226	203	176	396	franco-argiloso
	Sub.	197	218	244	341	franco-argiloso
	Sup.	234	258	161	347	franco-argiloso
	Sub.	197	221	208	374	franco-argiloso
	Sup.	158	171	232	439	argilo-limoso
	Sub.	143	203	256	399	franco-argiloso
	Sup.	243	217	162	377	franco-argiloso
	Sub.	272	214	151	362	franco-argiloso

OI 1	Sup.	126	162	242	470	argilo-limoso
	Sub.	123	151	247	478	argilo-limoso
OI 2	Sup.	139	134	394	334	franco-argilo-limoso
	Sub.	143	130	272	455	argilo-limoso
	Sup.	251	271	99	379	argilo arenoso
	Sub.	217	246	177	360	franco-argiloso
	Sup.	276	216	137	371	franco-argiloso
	Sub.	300	189	140	371	franco-argiloso

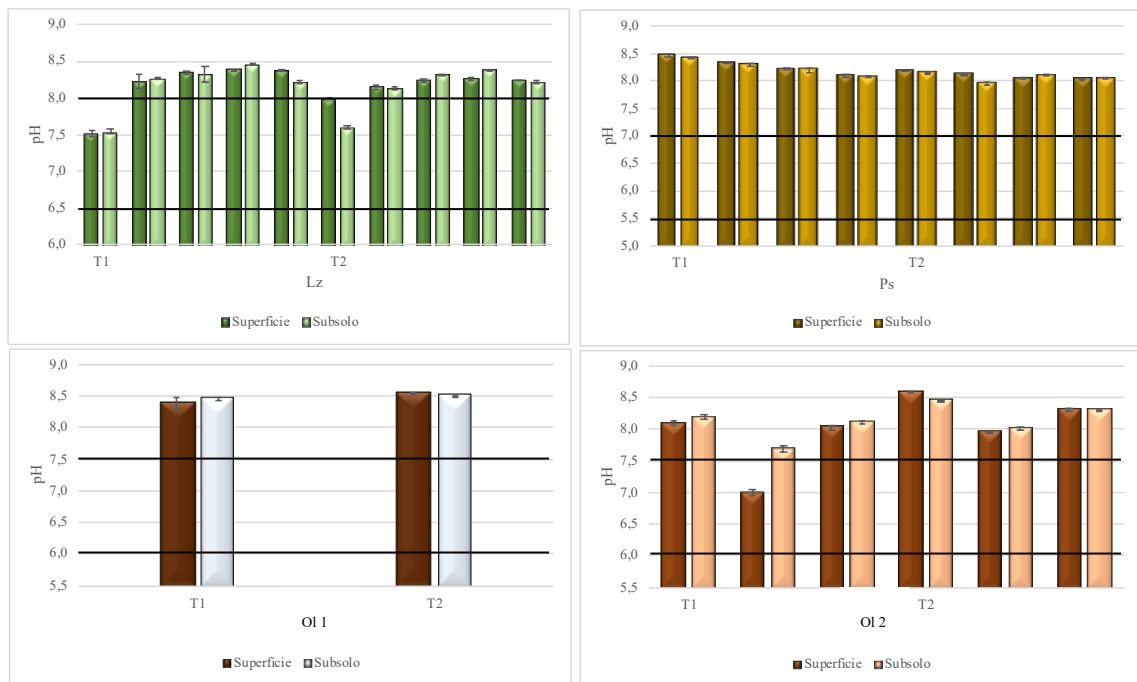
#### 4.1.2. pH

Os resultados da avaliação dos solos agrícolas correspondentes às parcelas a monitorizar, indicam, globalmente, solos de pH ligeiramente alcalino (Figura 10), característicos do Baixo Alentejo, com vários locais a ultrapassarem o valor de pH 8,0. Em cada um dos gráficos é apresentada a faixa de pH ótima para a cultura em questão. Com exceção da luzerna, que apresenta um pH favorável para produções de referência entre 5,5-8,0, o pH ligeiramente alcalino é menos favorável ao desenvolvimento das culturas monitorizadas, dada a sua influência negativa na disponibilidade de alguns nutrientes, sendo que o intervalo ótimo de pH se situa entre 5,5 e 7,0. Em geral, o pH ligeiramente alcalino observado é resultante das características calcárias dos solos em análise. Os solos calcários apresentam um grande poder tampão, sendo difícil a sua acidificação. Habitualmente, a acidificação dos solos, quando realizada, opera-se com a incorporação de corretivos acidificantes como o enxofre ou o sulfato de alumínio.

Relativamente aos resultados obtidos às duas profundidades, eles não apresentam, aparentemente, diferenças significativas.



Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)



**Figura 10-** Variação do parâmetro pH (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela. As linhas a preto representam o intervalo de pH ótimo para cada uma das culturas (Santos, 2015).

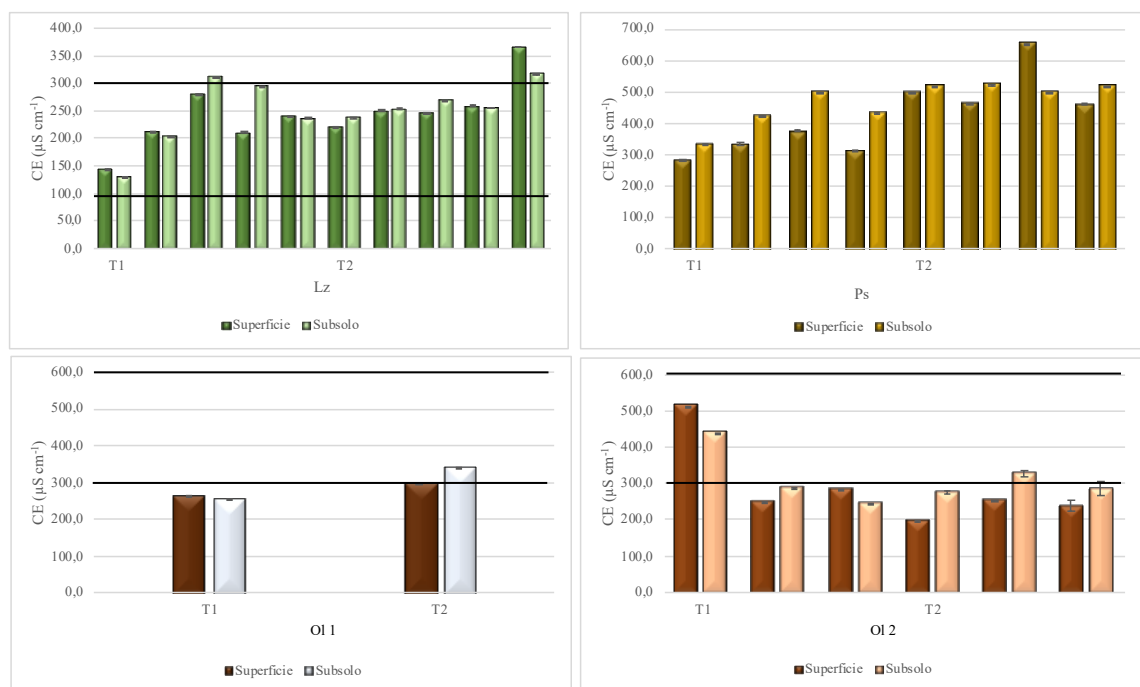
#### **4.1.3. Condutividade elétrica**

Em relação à CE, um indicador da salinidade dos solos, de uma forma geral, todas as amostras de solos apresentam valores de CE baixos, que permitem a sua classificação como solos não salinos ( $<400 \mu\text{S cm}^{-1}$ ; segundo Varennes, 2003) (Figura 11). Porém, este valor foi ultrapassado em algumas das amostras do solo da pastagem, que apresentou valores de CE mais altos, característicos de solos muito pouco salinos ( $400-800 \mu\text{S cm}^{-1}$ ; segundo Varennes, 2003), o que pode ser devido ao seu uso pouco intensivo, o que permite a retenção de elementos minerais no solo. Em geral, no caso de solos cultivados, a CE aumenta no final do ciclo cultural, o que pode estar relacionado com a qualidade da água de rega aplicada e com a fertilização.

Para as culturas que têm intervalos de salinidade ótimos, estes foram indicados no gráfico. Em relação à tolerância da luzerna à salinidade, e apesar de ser classificada como sendo uma cultura sensível ( $100-300 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), os valores de condutividade apresentados na parcela não são prejudiciais à obtenção de taxas de produção ótimas, tendo sido ultrapassados no solo arável em apenas um dos locais.

Relativamente aos resultados obtidos às duas profundidades, e à semelhança dos resultados obtidos para o pH, eles não apresentam, aparentemente, diferenças significativas.

Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)



**Figura 11-** Variação da condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) (média $\pm$ desvio padrão;  $n=3$ ), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha). As linhas a preto representam o intervalo de CE ótima para cada uma das culturas (Santos, 2015).

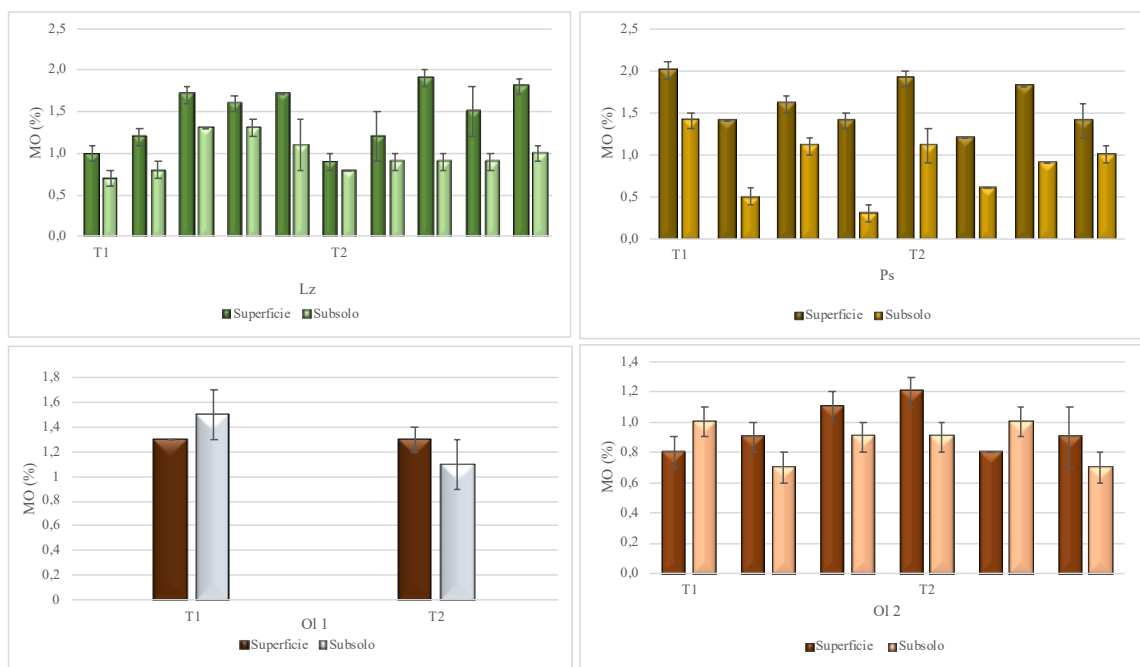
#### **4.1.4. Matéria orgânica**

De uma forma geral, os solos apresentam teores de MO, para solos de textura média a fina, muito baixos ( $<1\%$ ), no olival 2, a baixos (1,1-2,0), para a luzerna, e olival 1, observando-se alguma variabilidade entre os dois tempos de amostragem, T1 e T2. Na pastagem, os teores de MO superiores a 2%, podem estar relacionados com a atividade de pastoreio e com a ausência de mobilização do solo, o que permite o seu enriquecimento em MO relativamente aos demais (Figura 12). De uma forma geral, estes teores de MO são características dos solos do Baixo Alentejo, com forte influência do clima mediterrânico. De facto, a baixa precipitação e a concentração da chuva no inverno reduzem o potencial de produção de biomassa, e a temperatura média anual elevada aumenta a taxa de mineralização da MO do solo (Carvalho, 2019).

Os baixos teores de MO podem levar ao aumento da adubação mineral, para compensar os baixos teores de azoto no solo, com o consequente aumento da transferência de nutrientes para as águas superficiais e subterrâneas, por processos de escoamento superficial e lixiviação.

Relativamente aos resultados obtidos às duas profundidades, é possível observar que, de um modo geral, foram obtidos teores de MO superiores na camada arável, sendo esses valores menores no subsolo (20-50 cm). Este facto é mais notório no caso do solo com luzerna e com pastagem, principalmente no solo de pastagem, em que é visível um enriquecimento em MO na camada arável, relativamente aos solos de olival.

Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)



**Figura 12-** Variação do teor em matéria orgânica (% m/m) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

#### 4.1.5. Azoto

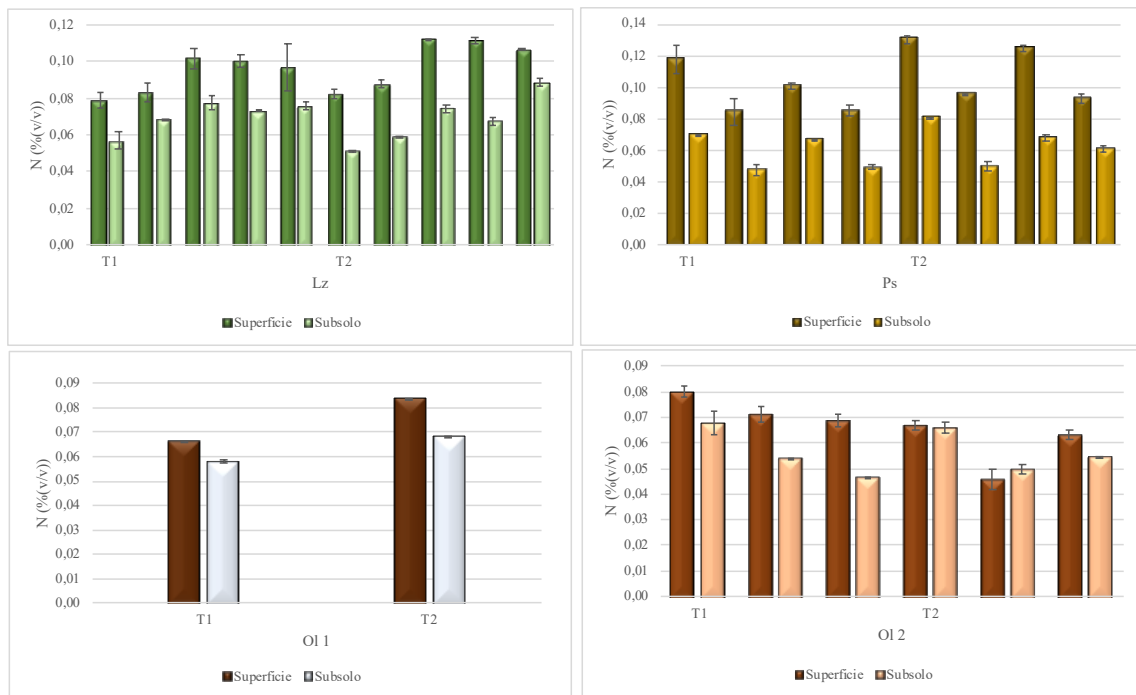
O azoto é um macronutriente principal, sendo o elemento cuja deficiência no solo mais frequentemente restringe a produção (Gonçalves, 2005). Em Portugal, ainda não é utilizado nenhum método de análise de terra que permita fundamentar, com segurança, as recomendações de fertilização com azoto para a maioria das culturas. Este facto resulta do comportamento do azoto no solo, sendo muito móvel na forma de ião nitrato (principal forma absorvida pelas plantas) (INIAP, 2006).

De acordo com Wild (1993), os teores em azoto nos solos das regiões temperadas podem variar entre 0,1 e 0,3% (g N/100 g de solo) nos primeiros 15 cm do perfil dos solos, sendo que nas regiões áridas, o mesmo valor pode andar abaixo dos 0,1% (g N/100 g de solo).

Em geral, os teores de azoto de Kjeldahl nos solos das parcelas monitorizadas, encontram-se entre 0,08-0,10% (Figura 13), sendo, por isso, teores característicos de regiões áridas. A pastagem é a parcela que apresenta teores de azoto superiores, com valores entre 0,10-0,12%, o que pode ser justificado pelos teores mais elevados de MO nesta parcela, e pela fixação de azoto pelas leguminosas existentes. Este facto, justifica também o aumento de azoto no solo observado na parcela da luzerna, em T2 (onde pode ter ocorrido a fixação de azoto pela planta). No final do ciclo cultural de ambas as amostras, exceto no olival 2, observou-se um aumento da concentração de Kjeldahl no final do ciclo cultural (T2), o que pode ser justificado por vários fatores: (i) mineralização da MO; (ii) fixação de azoto pelas leguminosas existentes, e/ou (iii) fertilização realizada durante o ciclo cultural.

Relativamente aos resultados obtidos às duas profundidades, é possível observar uma tendência de variação que acompanha os resultados obtidos para o teor em MO: de um modo geral, foram obtidos teores de azoto superiores na camada arável (0-20 cm), sendo esses valores menores no sub-solo (20-50 cm). Este facto é mais notório no caso do solo com luzerna e com pastagem, principalmente no solo de pastagem, em que é visível um enriquecimento em azoto na camada arável, relativamente aos solos de olival.

Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)

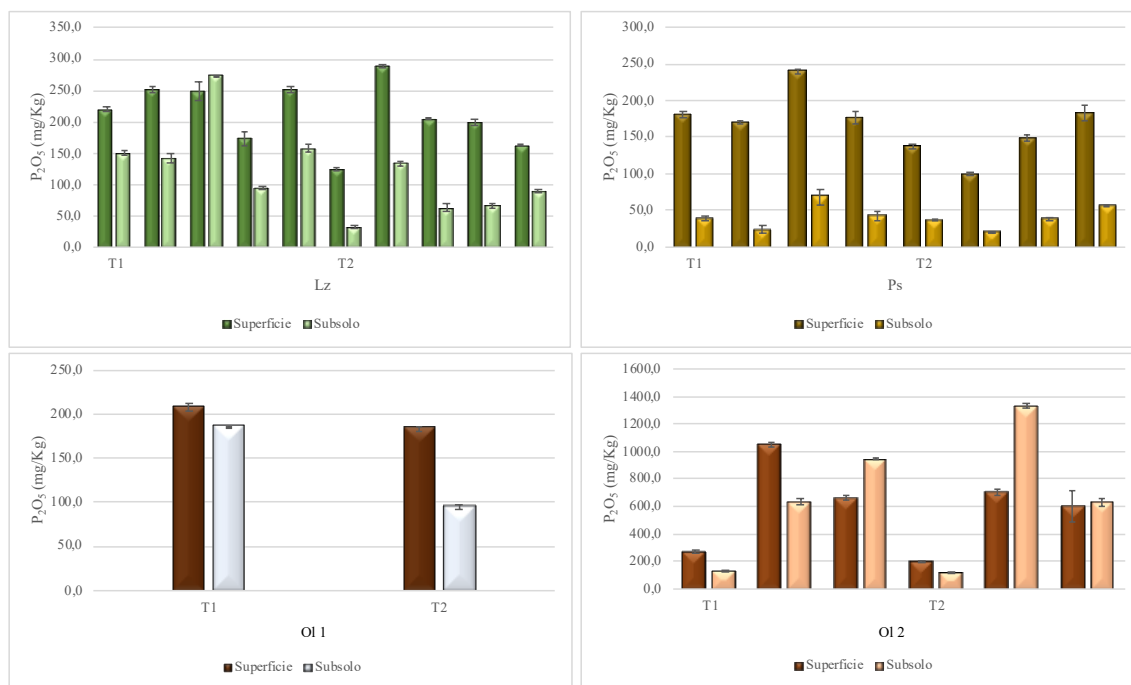


**Figura 13-** Variação do teor em azoto Kjeldahl (% m/m) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

#### 4.1.6. Fósforo

A maioria dos solos são naturalmente pobres em fósforo disponível para as plantas, outro macronutriente principal, realidade que é revertida com a continuada adubação das culturas, ao longo dos anos, tornando os solos mais ricos neste macronutriente (INIAP, 2006). De um modo geral, os teores quantificados nos solos monitorizados (na camada arável e subsolo), segundo as classes de fertilidade, são: altos (101-200 mg/1000 g de solo) a muito altos (>200 mg/1000g de solo) (INIAP, 2006) (Figura 14). O subsolo da pastagem apresentou concentrações médias deste macronutriente (< 50 mg/1000 g de solo), segundo as classes de fertilidade referidas (INIAP, 2006). Apesar do ligeiro decréscimo dos quantitativos de fósforo extraível no final do ciclo cultural (T2), justificado pela assimilação pela planta, este macronutriente manteve-se sempre em concentrações elevadas, segundo as classes de fertilidade.

Relativamente aos resultados obtidos às duas profundidades, de um modo geral, foram obtidos teores de fósforo muito superiores na camada arável, sendo esses valores menores no subsolo. Este facto é mais notório no caso do solo de pastagem.

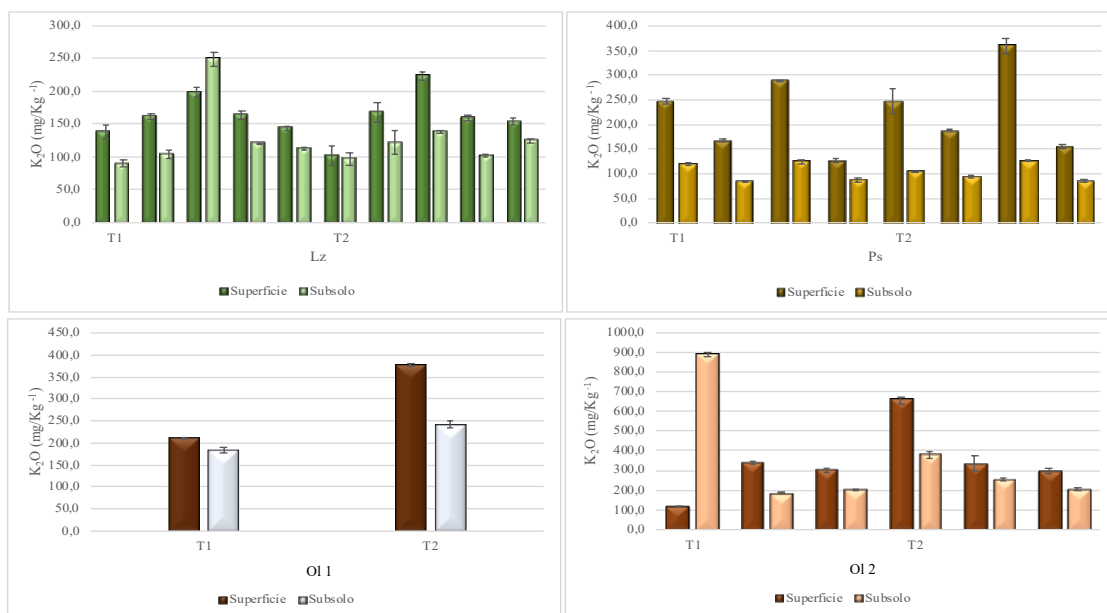


**Figura 14-** Variação do teor em fósforo extraível (mg/Kg) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas tem haver com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).



#### 4.1.7. Potássio

O potássio também é um macronutriente principal e, contrariamente ao fósforo, a maioria dos solos agrícolas apresenta naturalmente teores elevados de potássio, uma vez que este elemento faz parte da constituição de muitos minerais, com exceção dos solos derivados de areias e arenitos, cujo mineral principal é o quartzo. O aumento das produções, normalmente conseguida à custa de doses elevadas de N e P, conduz a grandes consumos de potássio pela planta. Havendo potássio em abundância, a sua absorção pode ser feita para além das necessidades da planta, em regimes de consumo de luxo, criando-se situações antieconómicas (INIAP, 2006). Por outro lado, doses elevadas de potássio podem conduzir a desequilíbrios com outros nutrientes, nomeadamente com o magnésio. À semelhança do que se observou para o fósforo extraível, os teores de potássio extraível quantificados nos solos monitorizados (na camada arável e subsolo), segundo as classes de fertilidade, são: altos (101-200 mg/1000 g de solo) a muito altos (>200 mg/1000g de solo) (INIAP, 2006) (Figura 15). De uma forma geral, observaram-se concentrações ligeiramente mais baixas nas amostras de subsolo, relativamente às respetivas amostras de solo.



**Figura 15-** Variação do teor em potássio extraível (mg/Kg<sup>-1</sup>) (média±desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

## 4.2. Caracterização da atividade enzimática

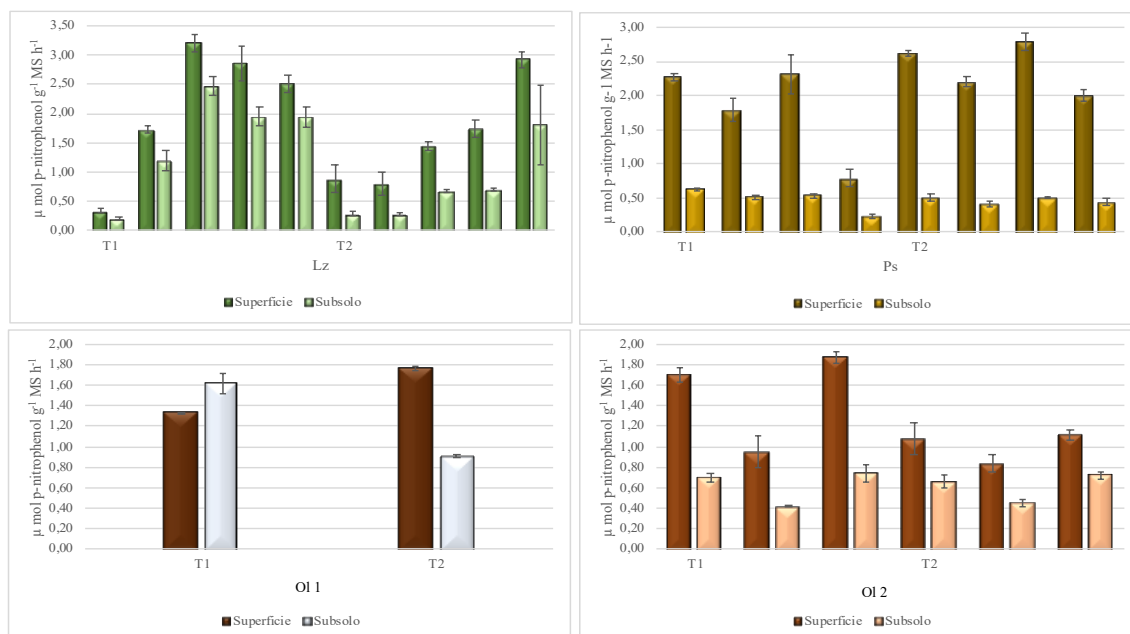
A qualidade do solo pode ser definida em função da capacidade para o desempenho das suas funções, nomeadamente, a capacidade para regular o fluxo de água e solutos, degradar e imobilizar compostos orgânicos e inorgânicos e atuar no ciclo de nutrientes, para além de manter a diversidade biológica (Seybold *et al.*, 1998). Para se compreender o comportamento da atividade enzimática nos diferentes solos, foram avaliadas as atividades enzimáticas de algumas exoenzimas, pertencentes a ciclos biogeoquímicos de alguns elementos importantes no solo, neste caso a  $\beta$ -glucosidase (ciclo do carbono), a fosfatase ácida (ciclo do fósforo), e a urease (ciclo do azoto). Foi também medida a atividade enzimática da desidrogenase, a qual, sendo uma enzima envolvida na cadeia de transferência de eletrões, ativa em microrganismos vivos no solo, pode ser utilizada como um indicador de atividade microbiana.

### 4.2.1. $\beta$ -glucosidase

A atividade da  $\beta$ -glucosidase, enzima com um papel importante na fase final da degradação da celulose, apresentou valores de atividades enzimáticas superiores nos solos com luzerna (0,20-3,20  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) e pastagem (0,23-2,79  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ), em relação aos solos do olival 1 (0,91-1,77  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) e olival 2 (0,42-1,87  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) (Figura 16). Estes resultados já eram esperados, uma vez que foram também os solos da luzerna e pastagem que apresentaram os teores mais elevados de MO, relativamente aos solos do olival, 1 ou 2.

É interessante notar que, no caso da pastagem, onde não há mobilização do solo, a atividade enzimática da  $\beta$ -glucosidase é superior na camada 0-20 cm, justamente aquela onde o teor de MO é maior, enquanto que na luzerna, onde há mobilização do solo, essa atividade enzimática é mais homogénea nas duas camadas.

Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)



**Figura 16-** Variação do parâmetro  $\beta$ -glucosidase ( $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

#### 4.2.2. Fosfatases ácidas

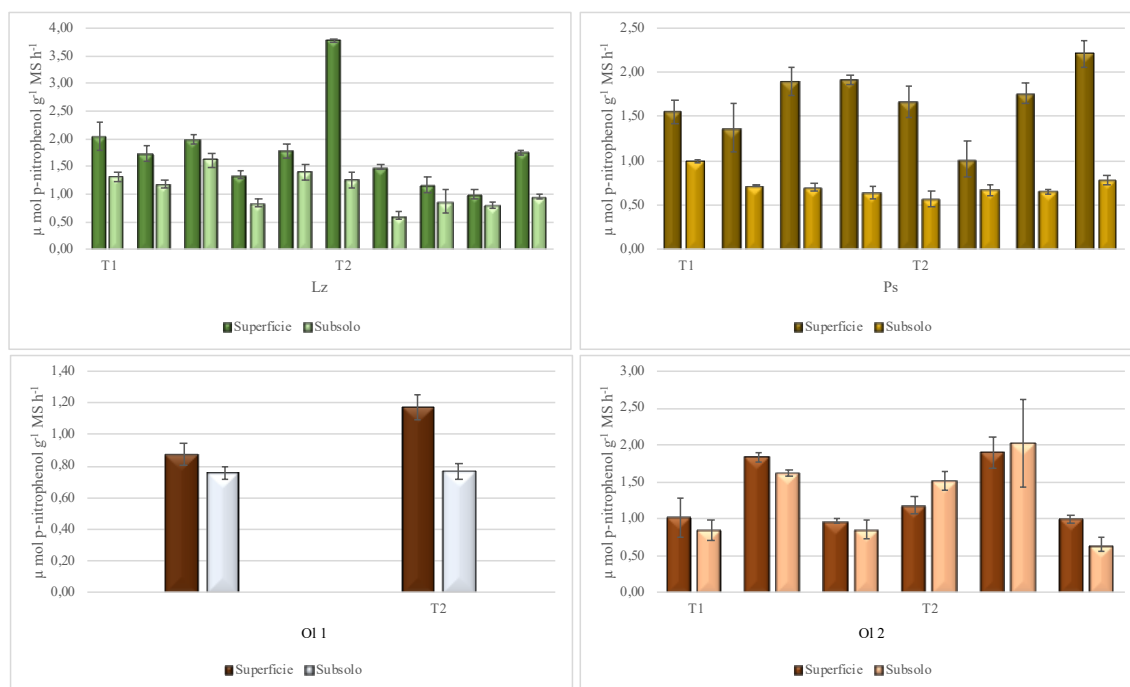
As fosfatases ácidas são enzimas chave no ciclo do fósforo, e catalisam as reações de hidrólise dos componentes orgânicos fosfatados, sendo referidas como indicadores da atividade microbiana (Cunha-Queda,1999). De acordo com Alef & Nannipieri (1995), a sua atividade é influenciada não só pelo pH e temperatura, mas também pelo teor em MO e tipo de solo.

Os resultados obtidos para a atividade enzimática das fosfatases ácidas seguiram o mesmo padrão de variação da  $\beta$ -glucosidase, tendo sido superiores no solo com luzerna (0,08-1,33  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) e com pastagem (0,57-2,22  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) relativamente ao solo com olival 1 (0,76-1,18  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) e com olival 2 (0,65-2,03  $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ). Neste caso, os resultados do olival 1 foram inferiores aos do olival 2, que se aproximaram mais dos resultados da atividade nos solos com luzerna e pastagem (Figura 17).

Tal como no caso da  $\beta$ -glucosidase, também a atividade das fosfatases ácidas na pastagem foram superiores na camada 0-20 cm, justamente aquela onde o teor de MO é maior, enquanto que na luzerna, onde há mobilização do solo, essa atividade enzimática é mais homogénea nas duas camadas.

Este bioindicador é sensível ao tipo de adubação aplicada e à aplicação de fitofármacos, podendo ser justificado o seu decréscimo no olival 1 pela aplicação mais intensa de fitofármacos.

Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)



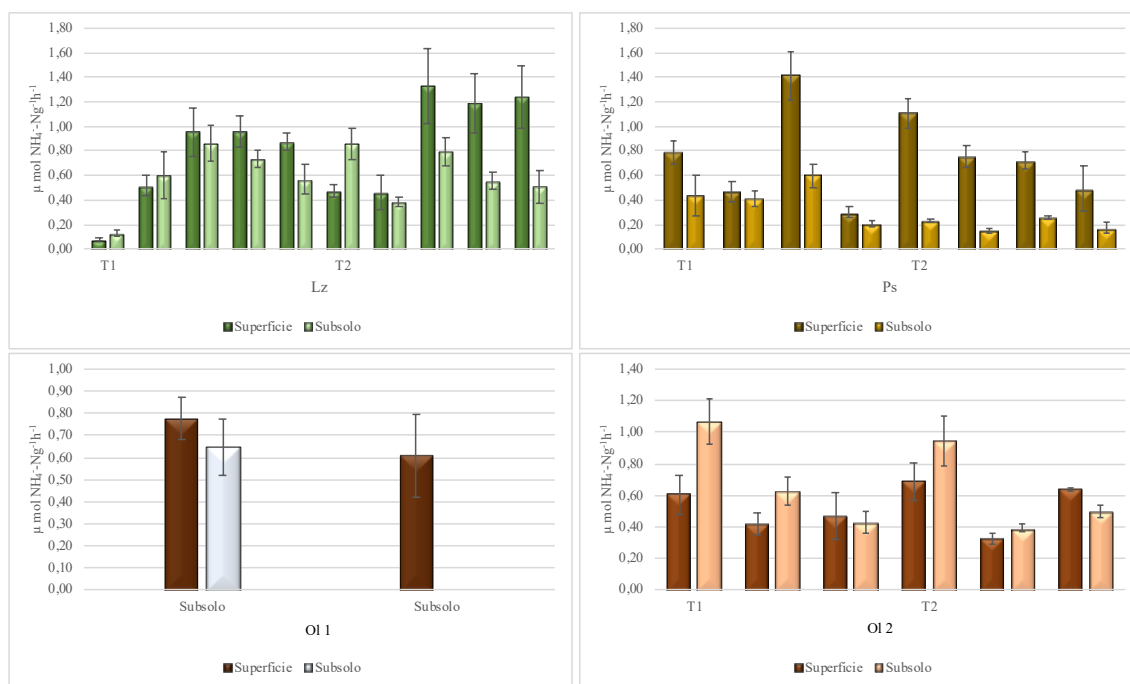
**Figura 17-** Variação do parâmetro fosfatases ácidas ( $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) (média $\pm$  desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

### 4.2.3. Urease

A urease pode ser produzida por plantas e microrganismos (principalmente bactérias) e está diretamente relacionada com o ciclo do azoto, responsável por hidrolisar a ureia, libertando a  $\text{CO}_2$  e amónia no solo (Moreira & Siqueira, 2006).

Os resultados obtidos apresentaram valores de atividade enzimática de urease superiores no solo com luzerna (0,08-1,33  $\mu\text{mol NH}_4^+\text{-N g}^{-1}\text{ MS h}^{-1}$ ) e com pastagem (0,15- 1,41  $\mu\text{mol NH}_4^+\text{-N g}^{-1}\text{ MS h}^{-1}$ ), relativamente aos solos do olival 1 (0,00-0,78  $\mu\text{mol NH}_4^+\text{-N g}^{-1}\text{ MS h}^{-1}$ ) e do olival 2 (0,32-1,07  $\mu\text{mol NH}_4^+\text{-N g}^{-1}\text{ MS h}^{-1}$ ) (Figura 18).

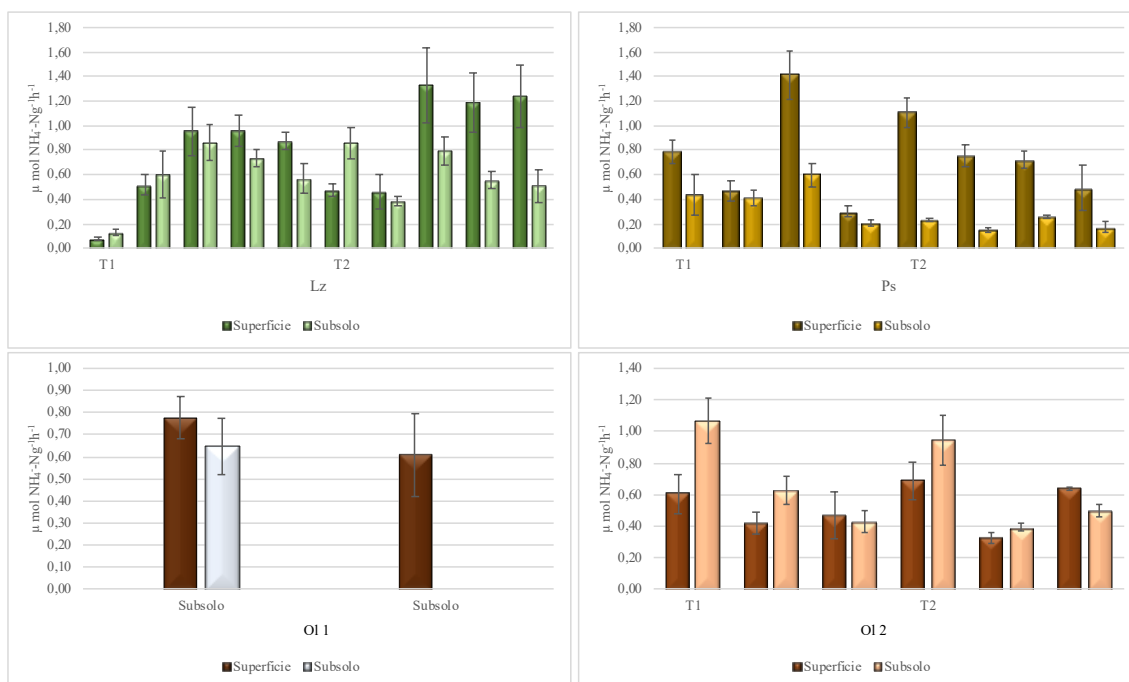
Segundo Dick (1988), a atividade da urease no solo decresce em profundidade. Esse facto foi muito visível nas amostras de solos de luzerna e de pastagem, em que se observou um decréscimo da atividade em profundidade, muito acentuado nalguns dos casos.



**Figura 18-** Variação do parâmetro ureases ( $\mu\text{mol NH}_4^+\text{-N g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) (média $\pm$  desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

#### 4.2.4. Desidrogenases

A atividade da desidrogenase é um indicador global da atividade microbiana, e com um importante papel na degradação da MO. Os resultados obtidos para esta enzima foram superiores no solo de pastagem (1,00-28,64  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) e nos solos das parcelas de luzerna (-5,47-12,95  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ), relativamente aos valores do olival 1 (1,61-9,78  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) e olival 2 (0,10-6,91  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ ) (Figura 19), o que revela uma atividade microbiana mais favorável nos solo de pastagem, em concordância como os resultados obtidos para as outras enzimas analisadas. De facto, a baixa intensidade de aplicação de fatores de produção nos solos de pastagem contribuem para a sua melhor qualidade em termos bioquímicos. A aplicação de fitofármacos nas parcelas de olival, 1 e 2, pode ter tido uma influência negativa nas atividades das diferentes enzimas analisadas.



**Figura 19-** Variação do parâmetro desidrogenase ( $\mu\text{g TPF. g}$ ) (média $\pm$  desvio padrão; n=3), em cada local de amostragem, na camada arável (superfície) até 20 cm de profundidade e no subsolo (20 a 40 cm), antes da campanha de rega (T1) e após campanha de rega (T2) de 2018. O número de colunas está relacionado com o número de amostras recolhidas por parcela (correspondendo a 1 amostra composta por cada 5 ha).

### **4.3. Caracterização ecotoxicológica**

Em relação à análise ecotoxicológica, foram utilizados organismos aquáticos que avaliam a função retenção do solo, testando a toxicidade da solução que se obtém por extração solo:água destilada, também chamada lixiviado. Caso o solo desempenhe bem a função retenção, retém os poluentes, não os transferindo para os lixiviado, e não promovendo toxicidade em organismo-teste, normalmente utilizados em bioensaios padronizados. Neste estudo, foram utilizados organismos aquáticos de água doce (*V. fischeri* e *P. subcapitata*), cujo resultados estão descritos e discutidos no ponto 4.3.1. e no ponto 4.3.2.

#### **4.3.1. Ensaio de inibição de luminescência com a bactéria *V. fischeri***

Na Tabela 9 encontram-se os resultados para o EC<sub>20</sub>, aos 30 minutos obtidos no ensaio de bioluminescência com a bateria *V. fischeri* para os lixiviados dos solos em análise. Para as concentrações utilizadas, não se verificou inibição de luz em 50% de indivíduos da população exposta, não sendo possível determinar, por isso, o EC<sub>50</sub>, o que indica que as amostras são pouco tóxicas para a bactéria. De uma forma geral, em relação ao EC<sub>20</sub> (%; concentração onde ocorre a inibição de luz em 20% da população exposta), verificou-se que as amostras recolhidas no T2 (olival 2 e pastagem), induzem maior toxicidade que as de T1, o que, no caso do olival, pode estar relacionado com o número de tratamentos fitossanitários que foram sendo aplicados à cultura, durante o ciclo vegetativo. Por outro lado, as amostras da camada arável apresentam maior toxicidade que as de subsolo, resultado que pode ser justificado pelas maiores concentrações de fitofármacos detetados na camada arável (Ver subcapítulo 4.4.).



**Tabela 9-** Valores de EC<sub>20</sub> (media ±desvio padrão) obtido no bioensaio com a bactéria *V. fischeri* quando exposta aos lixiviados dos solos em análise.

<i>V. fischeri</i> 30 min.- EC <sub>20</sub> (%)				
T1		T2		
Sup.	Sub.	Sup.	Sub.	
Luzerna	nt	nt	nt	10,8-11,9
	2,1- 2,7	nt	nt	nt
	nt	10,6-11,1	nt	11,1-11,7
Pastagem	nt	nt	6,2-6,8	20,6-21,3
	13,6- 14,1	nt	4,3-4,6	4,5-4,9
Olival 1	14,7- 15,3	nt	nt	nt
Olival 2	nt	nt	16,3-17,0	nt
	nt	11,9- 12,5	8,1-8,5	nt
	nt	13,4- 17,4	3,9-4,5	nt

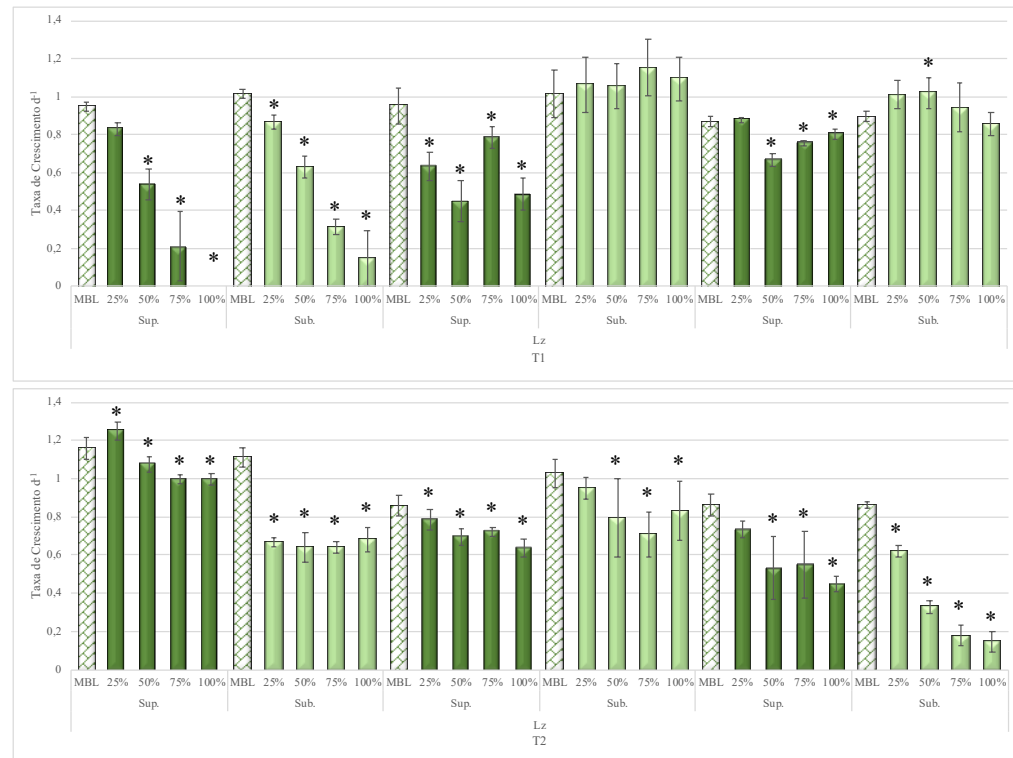
nt- não tóxico

#### 4.3.2. Ensaio com a microalga verde *P. subcapitata*

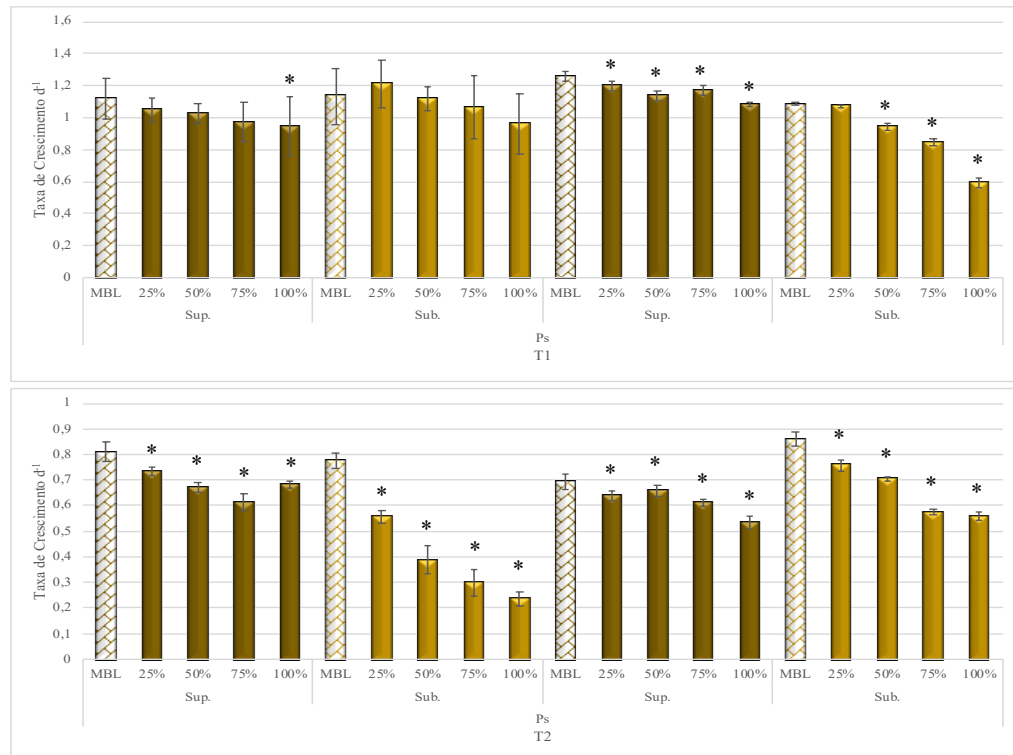
De uma forma, geral, os resultados evidenciam que a microalga *P. subcapitata* foi muito mais sensível aos lixiviados dos solos em análise que o *V. fischeri*, o que pode ser devido à aplicação de fitofármacos, nomeadamente herbicidas (extremamente tóxicos para algas; Palma *et al.*, 2008), nas culturas das parcelas em estudo.

Assim, em relação à inibição de crescimento da microalga *P. subcapitata*, os resultados mostraram que as amostras da camada arável induzem maior efeito tóxico que as amostras de subsolo (ANOVA;  $p < 0.05$  em comparação com o controlo). Estes resultados são semelhantes aos observados com a bactéria *V. fischeri*, indicando que as amostras na camada arável apresentam maior contaminação com substâncias tóxicas, o que pode ser comprovado pelos resultados de quantificação dos fitofármacos (Ver subcapítulo 4.4.). Por outro lado, quando comparamos a toxicidade entre os dois tempos de amostragem (antes e depois do ciclo cultural), verificamos que as amostras recolhidas em T2 induzem maior toxicidade com CENOs (concentração de efeito não observado)  $\leq 25\%$ , que as amostras recolhidas antes do início ciclo cultural (T1; CENOs entre 25 e 75%). Os solos das parcelas de olival 1 e 2 (Figuras 22 e 23), foram os que induziram maior inibição de crescimento da microalga, sempre com diferenças significativas em relação ao controlo a partir da concentração de 25% (Dunnet post hoc test,  $P \leq 0.05$ ). As amostras recolhidas do solo da pastagem (Figura 21) foram as que promoveram menores efeitos no crescimento da microalga, o que pode ser justificado por só ter sido aplicado adubo azotado, sem nenhuma aplicação de fitofármacos. No que respeita à parcela de solo da luzerna, o efeito muito significativo na inibição do crescimento da microalga em relação ao controlo (Dunnet post hoc test,  $P \leq 0.05$ ), pode ser justificado pela aplicação de Glifosato antes da sementeira, o que coincidiu com a recolha de solo para o T1.

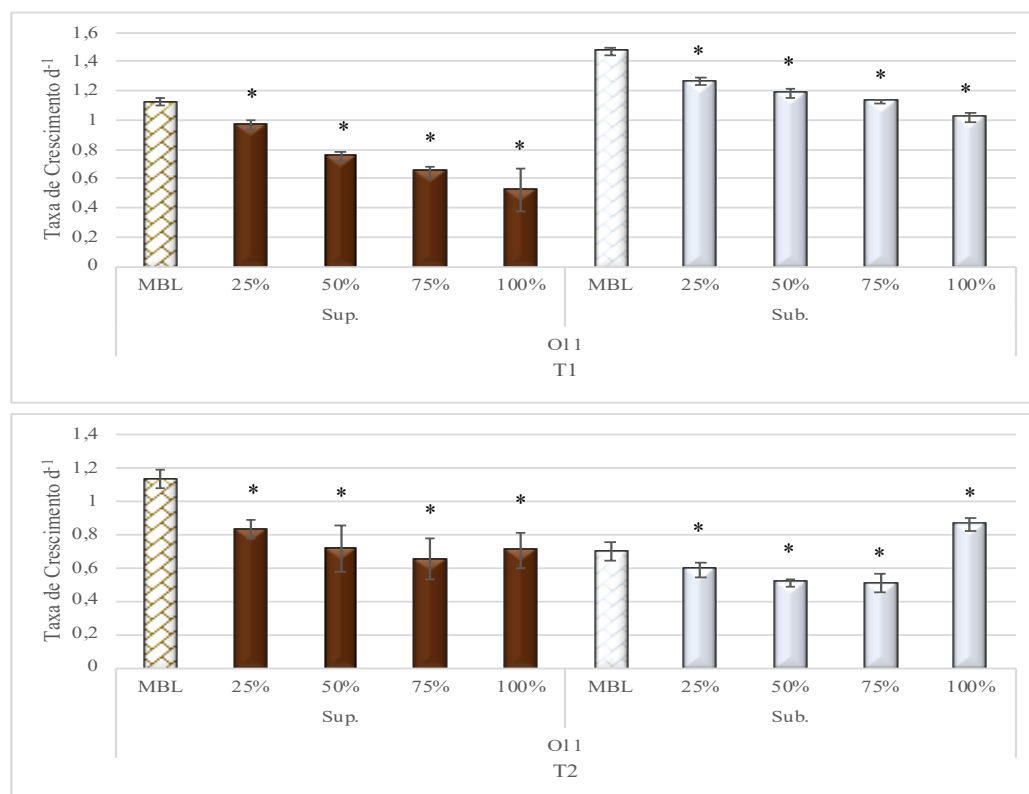
Avaliação de Risco Ambiental de Fitofármacos em Solos Agrícolas da Zona de Influência do EFMA  
(Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)



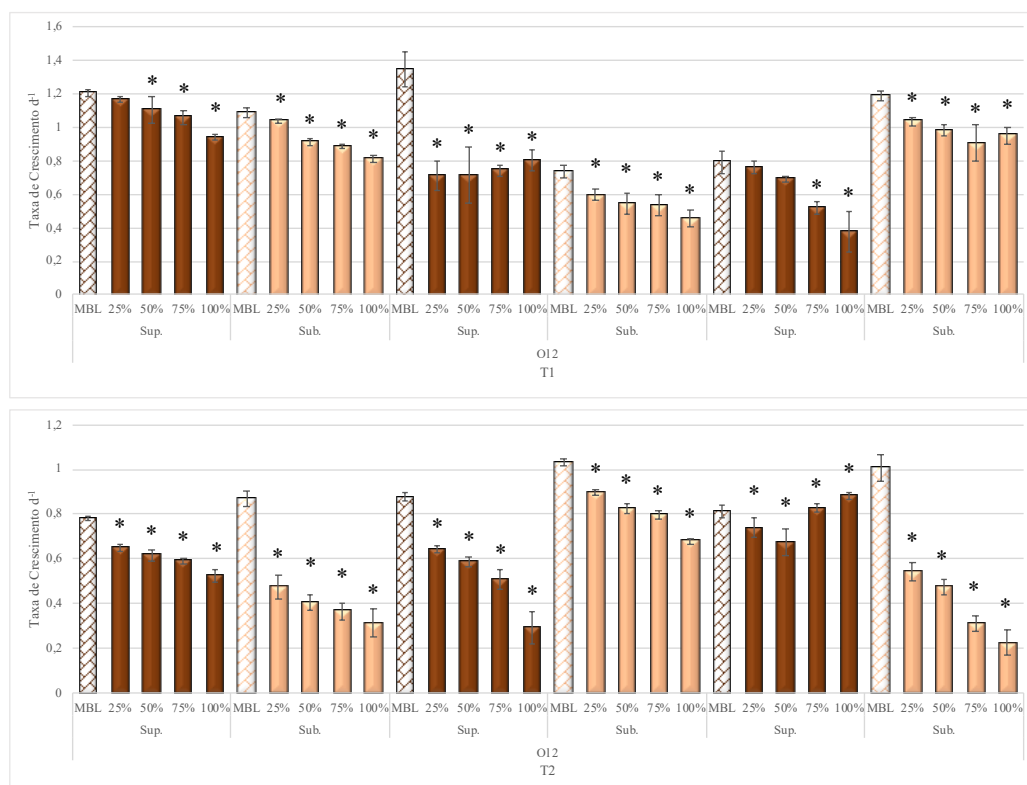
**Figura 20-** Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga *P. subcapitata* exposta durante três dias aos lixiviados, e respectivas diluições, de solo de luzerna (m dia  $\pm$  DP; n=6).



**Figura 21-** Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga *P. subcapitata* exposta durante três dias aos lixiviados, e respectivas diluições, de solo de pastagem (m dia  $\pm$  DP; n=6).



**Figura 22-** Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga *P. subcapitata* exposta durante três dias aos lixiviados, e respetivas diluições, de solo de olival 1 (m dia  $\pm$  DP; n=6).



**Figura 23-** Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) da microalga *P. subcapitata* exposta durante três dias aos lixiviados, e respetivas diluições, de solo de olival 2 (m dia  $\pm$  DP; n=6).

#### 4.4. Dinâmica e risco ecotoxicológico dos fitofármacos

Em relação à dinâmica dos fitofármacos, dos 44 compostos analisados foram detetados 12 compostos na amostragem T1, e 15 compostos na amostragem T2. Dos fitofármacos quantificados, o metolaclopro foi a única substância quantificada em todas as amostras analisadas. O metolaclopro é um herbicida pré-emergente com índice de lixiviação GUS de 2,36 (Tabela 10), o que indica que tem um potencial moderado de lixiviação, podendo, quando as condições de pH e temperatura forem favoráveis, atingir os lençóis freáticos (PPDB, 2007). Apresenta uma moderada persistência ambiental no solo com  $DT_{50}=90$  dias e um índice de bioacumulação alto, propriedades que também favorecem a sua possível lixiviação e acumulação nos organismos do ecossistema terrestre. O terbutrino (triazida) foi quantificado em 94% das amostras e o tiametoxame (neonicotinóide) em 75% das amostras. O terbutrino é um herbicida triazidico, que apresenta uma moderada capacidade de lixiviação e um tempo de meia-vida no solo de 74 dias (persistência moderada). Apresenta um  $\log K_{ow}= 3,66$ , elevado, o que indica capacidade para bioacumular, e um risco de bioamplificação na cadeia trófica. Estes dois fitofármacos apesar de serem herbicidas e terem toxicidades baixas para a fauna terrestre e aquática, devido às suas propriedades, podem constituir um risco de emissão para o ecossistema aquático e de acumulação a nível das cadeias tróficas. O fitofármaco que foi quantificado em maior concentração foi o diflufenicão ( $130,17 \text{ ng g}^{-1}$ ), seguido do terbutrino ( $10,04 \text{ ng g}^{-1}$ ). O diflufenicão é um herbicida que não tem propriedades de lixiviação, mas apresenta características que lhe conferem capacidade de bioacumulação e bioamplificação ao longo da cadeia trófica, o que pode ser potenciado pela sua moderada persistência ambiental.

Os solos das parcelas de olival 1 são os que apresentam maiores concentrações de fitofármacos (T1 - Fitofármacos<sub>totais</sub>=  $42,52 \text{ ng g}^{-1}$ ; T2 - Fitofármacos<sub>totais</sub>=  $120,69 \text{ ng g}^{-1}$ ), em oposição aos solos da pastagem em T1 (Fitofármacos<sub>totais</sub>=  $1,00 \text{ ng g}^{-1}$ ; T2 - Fitofármacos<sub>totais</sub>=  $20,80 \text{ ng g}^{-1}$ , Figura 24).

Em relação ao solo das parcelas de luzerna no T1 - Fitofármacos<sub>totais</sub>=  $1,89 \text{ ng g}^{-1}$  e no T2 - Fitofármacos<sub>totais</sub>=  $8,98 \text{ ng g}^{-1}$ . O fitofármaco que apresentou maiores concentrações no T1 quer na camada arável quer no subsolo foi o terbutrino. Este é um herbicida pré-emergente, utilizado para controlar algumas gramíneas e ervas daninhas de folhas largas

(PPDB, 2007). O seu índice de lixiviação GUS é 2,21 (potencial de lixiviação marginal) (Tabela 10).

Nos resultados do T2 nas parcelas de luzerna, na camada arável, o fitofármaco que se encontra em maior quantidade é a terbutilazina ( $1,66 \text{ ng g}^{-1}$ ) e no subsolo a clotianidina ( $1,17 \text{ ng g}^{-1}$ ). A terbutilazina é um herbicida que é aplicado para controlar as ervas daninhas. O seu índice de lixiviação GUS é de 2,19 (Tabela 10). A clotianidina é um inseticida muito persistente no solo e na água. O seu índice de lixiviação GUS é de 3,74 (alta lixiviação) (Tabela 10) (PPDB, 2007).

No solo das parcelas de olival 2, em T1, a quantidade de fitofármacos totais foi  $\text{Fitofármacos}_{\text{totais}} = 0,37 \text{ ng g}^{-1}$  e no T2 foi  $\text{Fitofármacos}_{\text{totais}} = 8,67 \text{ ng g}^{-1}$ . O fitofármaco que apresentou maiores concentrações em T1, na camada arável e no subsolo, foi o metolacoloro ( $T1_{\text{sup}} = 0,084 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $T1_{\text{sub}} = 0,083 \text{ ng g}^{-1}$ ). É um herbicida utilizado para controlar as ervas daninhas. O seu índice de lixiviação GUS é de 2,36 (Tabela 10) (PPDB, 2007).

Em T2 nas parcelas de olival 2, o imidaclopride ( $2,20 \text{ ng g}^{-1}$ ) é o fitofármaco que se encontra em maior concentração, e no subsolo a terbutilazina ( $0,83 \text{ ng g}^{-1}$ ). O imidaclopride é um inseticida, é altamente solúvel, não volátil e persistente no solo. O seu índice de lixiviação GUS é 3,69 (Tabela 10) (PPDB, 2007).

De um modo geral, as concentrações de fitofármacos na camada 0-20 cm foram sempre superiores às quantificados no subsolo. O solo das parcelas de olival 1 foram as que apresentaram maior quantidade de inseticidas (neonicotinóides, organofosforados e carbamatos), substâncias mais tóxicas para a fauna terrestre, podendo acentuar a perda de biodiversidade. Este facto pode promover o aumento de risco, pois alguns dos neonicotinóides detetados, como a clotianidina e o imidaclopride, apresentam persistências ambientais elevadas, permanecendo nos solos onde são aplicados por longos períodos de tempo.

O dimetoato foi o único dos fitofármacos mencionado nos itinerários culturais que foi detetado nos solos das parcelas agrícolas. Todos os restantes fitofármacos quantificados não se encontravam nos itinerários das culturas.

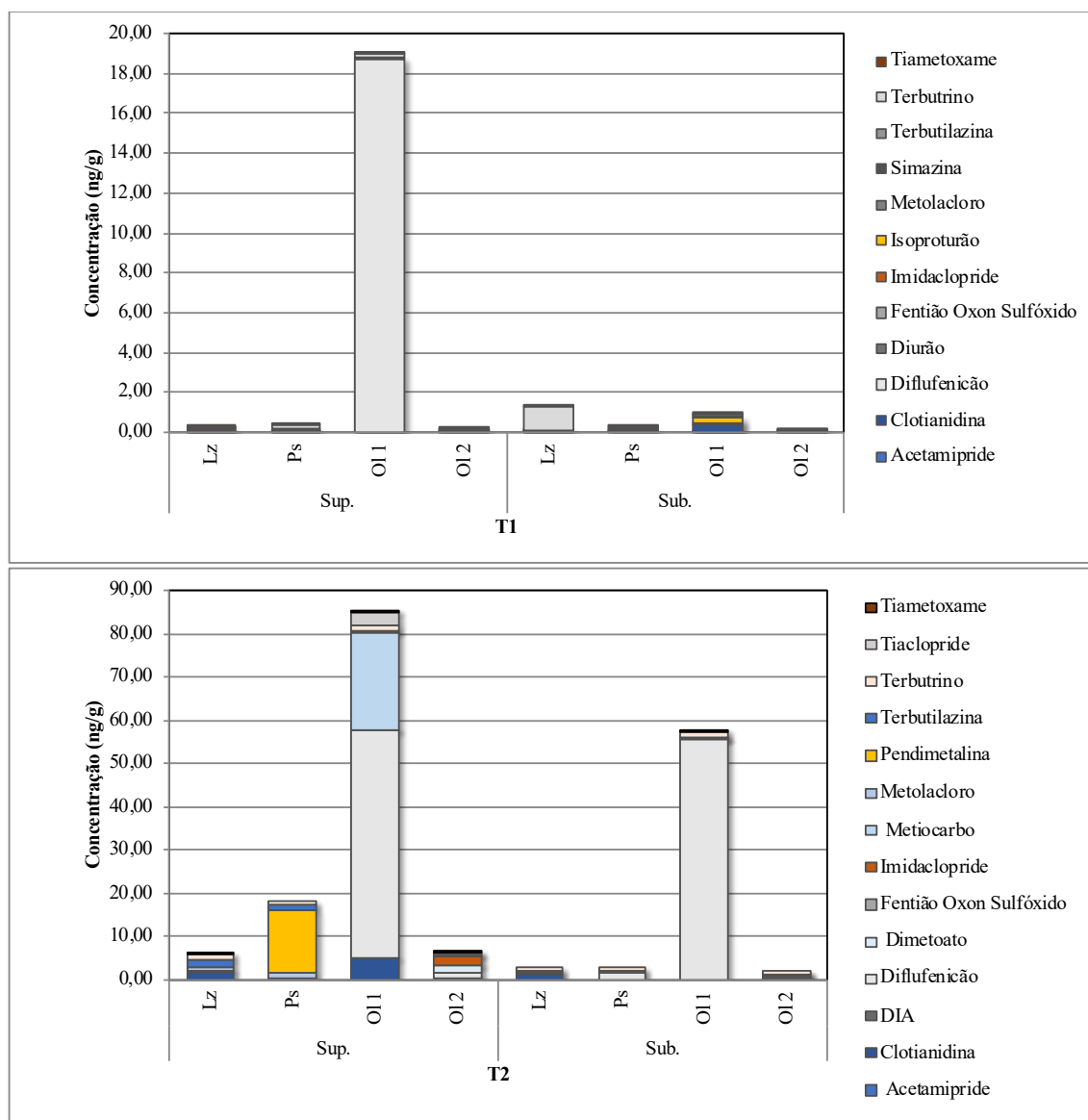
**Tabela 10-** Propriedades dos diferentes fitofármacos analisados: tempo de meia-vida no solo (DT<sub>50</sub>), coeficiente de partição octanol/água (log K<sub>ow</sub>), índice de Gus a pH 7 e 20°C, e concentrações tóxicas para invertebrados do solo (PPDB, 2007).

Fitofármaco	DT <sub>50</sub> (solo)	Índice de Gus	log K <sub>ow</sub>	<i>Folsomia candida</i>	<i>Eisenia fetida</i>	Concentração Crítica <sup>1</sup>	Fator de Incerteza	CENO mg kg <sup>-1</sup>
				mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>			
Triazinas								
DIA	45	3,24	1,15	-	-	-	-	-
Simazina	60	2,2	2,3	Inofensivo	1000 (LC <sub>50</sub> )	1000	1000	1
Terbutilazina	72	2,19	3,4	-	>141,7 (LC <sub>50</sub> )	141,7	1000	0,1417
Terbutrino	74	2,21	3,66	-	>170 (LC <sub>50</sub> )	170	1000	0,17
Phenilureias								
Diurão	146,6	2,65	2,87	22,35	15,78	15,78	100	0,1578
Isoproturão	12	2,61	2,5	-	>1000 (LC <sub>50</sub> )	1000	1000	1
Cloroacetanilidas								
Metolacoloro	90	2,36	3,4	-	26,65	26,65	100	0,2665
Organofosforados								
Fenitrotião	2,7	0,48	3,32	-	25	25	100	0,25
Dimetoato	2,5	2,18	0,75	2,5	2,87	2,5	100	0,025

<sup>1</sup> **Concentração Crítica-** concentração toxicológica utilizada em relação ao organismo mais sensível.

<u>Carboxamíde</u>								
<b>Diflufenicão</b>	94,5	1,19	4,2	5000	500 (LC <sub>50</sub> )	500	1000	0,5
<u>Neonicotinóide</u>								
<b>Acetamipride</b>	1,6	0,94	0,8	0,27	1,26	0,27	100	0,0027
<b>Clotianidina</b>	545	3,74	0,905	-	2,5	2,5	100	0,025
<b>Imidaclopride</b>	191	3,69	0,57	-	0,178	0,178	100	0,00178
<b>Tiaclopride</b>	0,88	1,1	1,26	-	62,5	62,5	100	0,625
<b>Tiametoxame</b>	50	3,58	-0,13	-	5,34	5,34	100	0,0534
<u>Carbamato</u>								
<b>Metiocarbo</b>	2,94	1,82	3,18	<37,5	0,161	0,161	100	0,00161
<u>Dinitroanilina</u>								
<b>Pendimetalina</b>	182,3	-0,28	5,4	193	33,45	33,45	100	0,3345





**Figura 24-** Concentrações obtidas para os fitofármacos detetados (ng/g) nas diferentes parcelas avaliadas, em T1 (gráfico superior), e T2 (gráfico inferior).

Em relação ao risco ambiental este estudo permitiu fazer uma avaliação preliminar do risco ecotoxicológico para a fauna terrestre de macroinvertebrados. De acordo com os resultados obtidos e tendo em consideração que os dados ecotoxicológicos, dos compostos analisados, estão restritos ao nível trófico dos macroinvertebrados terrestres, necessitando de avaliações com outras espécies de diferentes níveis tróficos para resultados mais abrangentes e conclusivos. Assim, os resultados da avaliação de risco nos solos em estudo evidenciaram que, de uma maneira geral, os fitofármacos se encontravam em concentrações abaixo das concentrações de efeito não observado (CENO), indicando que não induzem risco ecotoxicológico para os macroinvertebrados terrestres.

Em relação à avaliação de risco permitiu-se fazer uma avaliação preliminar dos riscos para a fauna terrestre de invertebrados segundo a equação:

$$RQ = CAP/CENO$$

CAP- concentração ambiental do poluente

De acordo com os dados obtidos, os únicos fitofármacos cujas concentrações poderiam representar risco para as espécies de macroinvertebrados, foi o herbicida isoproturão que apresentou um risco de 26,90 no solo da parcela de olival 1 no subsolo e o inseticida metiocarbo (carbamato, com potencial de bioacumulação elevado) que apresentou um risco de 14 no solo da parcela de olival 1 na camada arável e imidaclopride (RQ=1,24) (Tabelas 11 e 12), no solo da parcela de olival 2 na camada arável.

**Tabela 11-** Classificação do risco dos diferentes fitofármacos analisados em T1.

			Acetami pride	Clotianid ina	Diflufeni cão	Diur ão	Fenitrot ião	Imidaclop ride	Isoprotu rão	Metioca rbo	Metolac oro	Simazi ne	Terbutila zina	Terbutr ino	Tiametoxa me
			RQ												
Lz	Sup.	T1	0,002	0,001				0,008			3,45E-04	2,20E-06	1,13E-05	6,73E-05	0,001
	Sub.		0,001	0,001							3,38E-04	1,07E-06		6,60E-04	2,55E-04
Ps	Sup.		0,001				4,51E-05				3,98E-04		6,00E-05	9,16E-05	3,49E-04
	Sub.		0,002	0,004							2,93E-04			7,34E-05	3,26E-04
OI 1	Sup.				0,004					14,00	3,60E-04			1,10E-04	0,001
	Sub.		0,001	0,013		0,001			26,90		3,34E-04			5,74E-05	0,001
OI 2	Sup.		0,001					0,018			3,15E-04	9,43E-07		2,92E-05	3,76E-04
	Sub.		0,001					0,012			3,11E-04	1,27E-06			4,64E-04

**Tabela 12-** Classificação do risco dos diferentes fitofármacos analisados em T2.

			Acetamipride	Clotianidina	Diiflufenicão	Dimetoato	Fenitrotião	Imidaclopride	Metolachloro	Pendimetalina	Terbutilazina	Terbutrina	Tiaclopride	Tiametoxame
			RQ											
Lz	Sup.	T2		0,062					3,06E-03		0,001	0,001		0,006
	Sub.			0,047					1,76E-03		2,04E-04	0,001		
Ps	Sup.								4,48E-03	0,043	0,001	4,89E-04		
	Sub.				3,26E-04				1,53E-03			4,68E-04		
OI 1	Sup.			0,191	0,011				1,24E-03			7,28E-04	0,005	0,012
	Sub.				0,011	0,003			1,32E-03			8,56E-04		0,006
OI 2	Sup.		0,033		1,84E-04	0,070	4,96E-04	1,236	1,24E-03			2,15E-04		0,009
	Sub.				6,84E-05	0,008		0,230	1,20E-03			4,86E-04		

## 5. Considerações Finais

A atual preocupação da sociedade sobre o impacto da agricultura no ambiente prende-se, essencialmente, com a utilização de fitofármacos. A dinâmica destas substâncias no ambiente é complexa, podendo conduzir à contaminação dos vários compartimentos ambientais, pelo que é fundamental dar resposta ao importante desafio de criar condições que contribuam para a devida proteção das culturas e seus produtos, se faça com o mínimo impacte possível no ambiente (Gonçalves, 2008).

Neste estudo, que teve como finalidade avaliar o risco ambiental dos fitofármacos em solos agrícolas na zona de influência do EFMA nas diferentes parcelas de luzerna, pastagem, olival 1 e olival 2, podemos salientar os seguintes aspetos:

- A textura dos solos analisados variou entre franco-argilo-arenoso, franco- argiloso, franco-argilo-limoso, franco-argiloso, argilo-arenoso e argilo-limoso, considerados solos de textura pesada.
- O pH dos solos é caracterizado por valores ligeiramente alcalinos em resultado das caraterísticas calcárias dos solos em análise. Os solos calcários apresentam um grande poder tampão, sendo difícil a sua acidificação.
- A CE dos solos de um modo geral, são caraterizados como não salinos. Em geral, a CE aumenta no final do ciclo cultural, o que pode estar relacionado com a qualidade da água de rega aplicada e com a fertilização. Em relação à MO, para solos de textura pesada, o olival 2 apresentou valores muito baixos, na luzerna e olival 1 baixos e relativamente à pastagem observou-se teores de MO superiores a 2%. De uma forma geral, estes teores de MO são características dos solos do Baixo Alentejo, que levam, normalmente ao aumento da adubação mineral, uma vez que indicam deficiências nutricionais associadas.
- No caso dos macronutrientes principais, para o azoto obtiveram-se valores baixos, característicos de solos de regiões áridas, em relação ao fósforo extraível, no geral, as classes de fertilidade dos solos foram altas a muito altas, enquanto que, para o potássio extraível, se obtiveram teores elevados.

Em relação à caraterização da atividade enzimática, nos solos onde não existiu mobilização de solos, os valores da  $\beta$ -glucosidase e da fosfatases ácidas foram superiores na camada arável, enquanto que, onde houve mobilização de solos, na luzerna e na  $\beta$ -

glucosidase, a atividade enzimática é mais homogênea tanto na camada arável como no subsolo.

Na urease registaram-se valores superiores na luzerna e pastagem relativamente aos solos do olival 1 e olival 2. O resultado obtido para a atividade enzimática da desidrogenase seguiu o mesmo padrão de variação da urease, tendo sido superiores no solo com luzerna e pastagem relativamente ao solo com olival 1 e olival 2.

A aplicação de fitofármacos nas parcelas de olival 1 e olival 2, pode ter tido uma influência negativa nas atividades das diferentes enzimas analisadas.

Relativamente à caracterização ecotoxicológica, em relação ao *V. fischeri*, as amostras de olival 2 e pastagem induzem maior toxicidade em T2 do que em T1. No olival 2, este facto pode estar relacionado com os tratamentos fitossanitários que foram aplicados na cultura. As amostras da camada arável apresentam maior toxicidade, podendo esta ser justificada pelas maiores concentrações de fitofármacos detetados na camada arável.

Tal como aconteceu com o *V. fischeri*, no caso da microalga *P. subcapitata*, as amostras de solo arável induzem maior efeito tóxico que as amostras de subsolo, tendo-se verificado ainda que, as amostras em T2 têm maior toxicidade comparativamente ao T1.

No que diz respeito à dinâmica dos fitofármacos, o metolaclopro foi a única substância quantificada em todas as amostras analisadas. O terbutrino foi encontrado em 94% das amostras e o tiametoxame em 75% das amostras. O solo que apresentou maiores concentrações de fitofármacos foi o solo da parcela de olival 1. De um modo geral, as concentrações dos fitofármacos na camada de solo arável são superiores comparativamente ao subsolo.

Em relação à avaliação de risco, os únicos fitofármacos cujas concentrações poderiam representar risco para as espécies de macroinvertebrados, foi o herbicida isoproturão que apresentou um risco de 26,90 e o inseticida metiocarbo (carbamato, com potencial de bioacumulação elevado) que apresentou um risco de 14 no solo da parcela de olival 1 e imidaclopride (RQ=1,24), no solo da parcela de olival 2. Os restantes fitofármacos encontram-se abaixo das concentrações de efeito não observado, indicando que não existe risco ecotoxicológico para os macroinvertebrados terrestres.

## 6. Bibliografia

- Abreu, M., Magalhães, M., Lousã, M., Cortez, N. (2007). *Estrutura Ecológica da Paisagem- Conceitos e delimitações*. Lisboa: Isa Press.
- Alef, K., Nannipieri, P., Cepeda, C. T. (1995). Phosphatase activity. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Academic Press. pp. 335-344.
- Alexandre, C. (2015). *A importância do solo- funções, propriedades, ameaças e proteção*. INIAV. Obtido em janeiro de 2019. [http://www.inia.pt/fotos/editor2/1\\_importancia\\_solo\\_carlosalexandre.pdf](http://www.inia.pt/fotos/editor2/1_importancia_solo_carlosalexandre.pdf)
- Alloway, B.J. (1995). *Heavy metals in soils*. 2<sup>nd</sup> ed. New York. Blackie Academic & Professional. pp. 368.
- Alvarenga, P. (1997). *Estudo da transferência de metais no sistema solo-planta na zona mineira de Aljustrel aplicados esteva (Cistus ladanifer L.)*. Tese de Mestrado em Química Analítica. Universidade de Évora. pp. 164.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A., Baião, N., Fernandes, R., Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Cunha-Queda, A. (2008). *Assessment of chemical, biochemical and ecotoxicological aspects in a mine soil amended with sludge of either urban or industrial origin*. Chemosphere. 72<sup>o</sup> Volume. pp. 1774–1781.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A., Fernandes, R., Varennes, A. d., Vallini, G., Queda, A. C. (2008). Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (II) Effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. Chemosphere.
- Alvarenga, P. (2009). *Utilização de Resíduos Orgânicos Biodegradáveis na Remediação de Solos Degradados por Atividades Mineiras*. Tese de Doutoramento em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, pp. 254.
- Alvarenga, P. (2015). *Sebenta de Poluição e Descontaminação de Solos*. Beja.

- Amaral, K. G. (2012). *Correlação entre fator de toxicidade e parâmetros Físico-Químicos para efluentes domésticos tratados*. Dissertação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.
- Angers, D.A., Bissonnette, N., L g re, A., Samson, N. (1993). *Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production*. Canadian Journal of Soil Science, Ottawa. 73º Volume. pp. 39- 50.
- Ara jo, A., Monteiro, R. (2007). *Biological indicators of soil quality*. Bioscience Journal, Uberl ndia. 23º Volume. pp. 66-75.
- Baird, C. (1999). *Environmental Chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. New York. W. H. Freeman and Company.
- Baldrian, P., Snajdr, J., Merhautov , V., Dobi sov , P., Cajthaml, T., Val skov , V. (2008). *Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change*. Soil Biology & Biochemistry, Praga. 56º Volume. pp. 60-68.
- Balota, E., Colozzi-Filho, A., Andrade, D., Dick, R. (2003). *Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems*. Biology and Fertility of Soils. 38º Volume. 38. pp. 15.
- Balota E., Kanashiro, M., Colozzi- Filho, A., Andrade, D., Dick, R. (2004). *Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems*. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo. 35º Volume. pp. 300-306.
- Bandick, A., Dick, R. (1999). *Field management effects on soil enzyme activities*. Soil Biology and Biochemistry. 31º Volume. pp. 1471-1479.
- Batista, S. (2003) *Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em ecossistemas agrícolas do Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral*. Dissertação. Doutorado. Instituto Superior de Agronomia Lisboa. pp. 464.
- Berger, B. (1998). *Improved chromatographic method for the simultaneous determination of ten phenylurea herbicides and some of their degradation products in soil*. J. Chromatography A. 769º Volume. pp. 338- 342.



- Bergstrom, D., Monreal, C., King, D. (1998). *Sensitivity of soil enzyme activities to conservative practices*. Soil Science Society of America Journal, Madison. 62º Volume. pp.1286-1294.
- Beutler, A., Centurion, J., Roque, C., Ferraz, M. (2005). *Densidade relativa ótima de Latossolos Vermelhos para a produtividade de soja*. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 29º Volume. pp.843-849.
- Blainski, E., Tormena, C., Fidalski, J., Guimarães, R. (2008). *Quantificação da degradação física do solo por meio da curva de resistência do solo a penetração*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa. 32º Volume. pp.975-983.
- Calamari, D., Vighi, M. (1990). *Quantitative Structure Activity Relationships in Ecotoxicology: Value and Limitations*. Chemosphere. 40(8) Volume. pp. 875-883.
- Caldwell, B. A., (2005). *Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review*. Pedobiologia. 49º Volume. pp. 635-644.
- Calouro, F., Leal, G., Campos, J., Funenga, M., Fátima Rocha, F. A., Silveira, H. L., Avelar, T. (1999). *Manual Básico de Práticas Agrícolas- Conservação do Solo e da Água*. Obtido em setembro de 2019, de [http://www.alensado.pt/images/doc/Man\\_Basico\\_Praticas\\_Agri.pdf](http://www.alensado.pt/images/doc/Man_Basico_Praticas_Agri.pdf)
- Campagna-Fernandes, A., Marin, E., Penha, T. (2016). *Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce (Lactuca sativa)*. Ecotoxicol. Environ. Contam. 11º Volume. 11. pp. 27-32.
- Caravaca, F., Alguacila, M., Torres, P., Roldán, A. (2005). *Plant type mediates rhizospheric microbial activities and soil aggregation in a semiarid Mediterranean salt marsh*. Geoderma. 124º Volume. pp. 375–382
- Carneiro, R., Mendes, I., Lovato, P., Carvalho, A., Vivaldi, L. J. (2004). *Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional*. Agropecuária Brasileira. 39º Volume. pp. 661-669.
- Carvalho, M., Lourenço, E. (2014). *Conservation agriculture- A portuguese case study*. Review article. Journal of Agronomy and Crop Science. 200º Volume. pp. 317-324.

- CCE (2006). *Proposta Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece um quadro de ação a nível comunitário para uma utilização sustentável dos pesticidas, apresentada pela Comissão*. Bruxelas. pp.47.
- Cerejeira, M.J. (2007a) *Textos de apoio às aulas: Resíduos de pesticidas. Dissipação. Degradação. Persistência. Pesticidas e Ambiente*. Instituto Superior de Agronomia Lisboa. pp. 65.
- COM. (2002). *Para uma estratégia Temática da Utilização Sustentável dos Pesticidas*. Obtido em outubro de 2019, de Comissão das Comunidades Europeias: <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2002/PT/1-2002-349-PT-F1-1.Pdf>
- Costa, L.G., Giordano, G., Guizzetti, M. & Vitalone, A. (2008). *Neurotoxicity of pesticides: a brief review*. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 13<sup>o</sup> Volume. pp. 1240–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981626>.
- Crane M., Burton G., Culp J., Greenberg M., Munkittrick K., Ribeiro R., Salazar M., St-Jean S.D. (2007). *Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis*. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 3<sup>o</sup> Volume. pp. 234– 245.
- Criquet, S., Ferre, E., Farnet, A., Le Petit, J. (2004). *Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors*. *Soil Biology & Biochemistry*, Marseille. 36<sup>o</sup> Volume. pp. 1111–1118.
- Cunha-Queda, C., (1999). *Dinâmica do azoto durante a compostagem de materiais biológicos putrescíveis*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agroindustrial, Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Decreto-lei nº 11/1987 de 7 de abril, DIÁRIO DA REPÚBLICA- I SÉRIE-A. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.
- Decreto-lei nº 77/2006 de 30 de março, DIÁRIO DA REPÚBLICA- I SÉRIE- A. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.

- Decreto-lei nº 276/2009 de 2 de outubro. DIÁRIO DA REPÚBLICA nº 192 – I SÉRIE-A. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.
- Dick, R. (1988). *Influence of long-term residue management on soil enzyme activity in relation to soil chemical properties of a wheat-follow system*. Soil Biology & Biochemistry. 6º Volume. pp. 159- 164.
- Dick, R., Breackwell, D., Turco, R. (1994). *Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators*. In: Doran, J.W.; Jones, A.J. (eds.) *Methods for assessing soil quality*. Madison: SSSA. pp. 247-271.
- Dick, R.P. (1994). *Soil enzyme activities as indicators of soil quality*. In: Doran, J.W. et al. (eds.) *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison: SSSA and ASA. pp. 107-124.
- Dick, R.P., Breakwell, D.P., Turco, R.F., (1996). *Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators*. In: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.), *Methods for Assessing Soil Quality*. Special Publication Nº. 49. Soil Science Society America, Madison, WI, USA. pp. 247–271.
- Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR). Guia das Explorações Agrícolas- Erosão. Obtido em setembro de 2019, de <http://guiaexploracoes.dgadr.gov.pt/recursos-naturais/solo/ameacas-ao-solo/erosao-do-solo>.
- Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho. (2013). Jornal Oficial Da União Europeia.
- Doran, J. W. (1980). *Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage*. Soil Science Society of America Journal. 44º Volume. pp. 765-771.
- ECC (European Community Commission). (2003). *Technical Guidance Document on Risk Assessment*. Part II. JRC. Brussels. Belgium.
- EDIA. (2017). *Relatório e Contas exercício de 2017*. Obtido em janeiro de 2020, de <http://edia.pt/wp-content/uploads/2019/05/rc2017pt.pdf>

- EDIA. (2019). *Ocupação Cultural*. Obtido em outubro de 2019, de Empresa de Desenvolvimento e Infra-estrutura do Alqueva, S.A.: <https://www.edia.pt/pt/o-que-e-o-alqueva/ocupacao-cultural/>
- Ekenler, M., Tabatabai, M. (2003). *Tillage and residue management effects on  $\beta$ -glucosaminidase activity in soils*. Soil Biology and Biochemistry, Oxford. 35º Volume. pp. 871-874.
- European Environment Agency. (2019). *Terra e solo na Europa*. Obtido em janeiro de 2019. <https://www.eea.europa.eu/signals/signals-2019>.
- FAO. (2018). *Proceedings of the Global Symposium on Soil Pollution 2018*. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations. pp. 976.
- Ferreira, A. M. (2000). *Dados Geoquímicos de Base de Sedimentos Fluviais de Amostragem de Baixa Densidade de Portugal Continental: Estudo de Factores de Variação Regional*. Obtido em janeiro de 2020, de Laboratório Nacional de Energia e Geologia: [https://www.lneg.pt/CienciaParaTodos/edicoes\\_online/teses/antonio\\_ferreira](https://www.lneg.pt/CienciaParaTodos/edicoes_online/teses/antonio_ferreira)
- Ferreira, J., Strecht, A., Serrador, F., Torres, L., Marques, J. C., Silva, M., *et al.* (2009). *As Bases da Agricultura Biológica, Tomo I, Produção Vegetal*. Lisboa: Edibio Lda. pp. 539.
- FitoFarmGest (2018). Obtido de <https://www.fitofarmgest.com/>, obtido a 4 de janeiro de 2019.
- Freire, C., Koifman, R., Sarcinelli, P., Simões-Rosa, A., Clapauch, R., Koifman, S. (2013). *Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil*. Environmental Research. 127º Volume. pp. 7–15. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2013.09.001>
- Friedel, J. K.; M lter, K. & Ficher, W. R. (1994). *Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iodonitrotetrazolium chloride*. Biology and fertility of soils. 4º Volume. pp. 291-296
- Garcia, C., Hernandez, T., Roldan, A., Martin, A. (2002). *Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate*. Soil Biology and Biochemistry, Oxford. 34º Volume. pp. 635-642.

- García-Ripoll, A., Amat, A., Arques, A., Vicente, R., Ballesteros Martín, M., Sánchez Pérez, J., Oller, I., Malato, S. (2009). *Confirming Pseudomonas putida as a reliable bioassay for demonstrating biocompatibility enhancement by solar photo-oxidative processes of a biorecalcitrant effluent*. J Hazard Mater. 162º Volume. pp. 1223-1227.
- García, J., Ventura, M., Requena, M., Hernández, A., Parrón, T., Alarcón, R. (2017). *Association of reproductive disorders and male congenital anomalies with environmental exposure to endocrine active pesticides*. Reproductive Toxicology. 71º Volume. pp. 95–100. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2017.04.011>
- Gianfreda, L., Rao, M., (2004). *Potencial of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review*. Enzyme and Microbial Technology. 35º Volume. pp. 339-354.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M., Seoane, S. (2005). *Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties*. Soil Biology & Biochemistry. 37º Volume. pp. 877-887.
- Girotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G., Maiolini, E. (2008). Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. Anal Chim Acta. 608º Volume. pp. 2-29.
- Gonçalves, M. (2005). *Agricultura e Ambiente: Gestão de Resíduos Orgânicos*. 1º ed. SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação. Porto.
- Gonçalves, M. d., Martins, J. C., & Ramos, T. B. (maio de 2017). *A salinidade dos solos: extensão, prevenção e recuperação*. Obtido em outubro de 2019, de Vida Rural: [http://www.inia.pt/fotos/editor2/a\\_salinidade\\_dos\\_solos.pdf](http://www.inia.pt/fotos/editor2/a_salinidade_dos_solos.pdf)
- Gonçalves, P. A. (2008). Contributo para a tomada de decisão no uso sustentável de pesticidas em vinha- Avaliação do perigo em recursos hídricos do Alentejo Central. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. Obtido de Instituto Superior de Agronomia.
- Grupo de Projeto Alqueva Agrícola. (2004). Caracterização da Zona de Alqueva. Obtido de Plano de Intervenção para a zona de Alqueva- Tomo 2: [http://sir.dgadr.gov.pt/conteudos/gpaa/tomos/tomo\\_2.pdf](http://sir.dgadr.gov.pt/conteudos/gpaa/tomos/tomo_2.pdf)
- Guilhermino, L., Diamantino T., Silva, M., Soares, A. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity. Ecotox Environ Safe. 38º Volume. pp. 292-295.

- Gupta, V., Germida, J. (1988). *Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation*. Soil Biology and Biochemistry, Oxford. 20<sup>o</sup> Volume. pp. 777-786.
- Gustafson, D. (1989) Groundwater Ubiquity Score: A Simple Method for Assessing Pesticide Leachability Environmental Toxicology and Chemistry. pp. 339-357.
- Hanna instruments. (23 de novembro de 2018). *Estojo Educacional para testes da Qualidade do solo*. Obtido em 5 de setembro de 2019, de <https://fdocumentos.com/document/estojo-educacional-para-testes-da-qualidade-do-prof-hi3896bppdf-o-teste-do.html>
- Hayat, K., Afzal, M., Aqueel, M., Ali, S., Saeed, M., Qureshi, A., Ullah, M., Khan, Q., Naseem, M., Ashfaq, U., Damalas, C. (2019). Insecticide toxic effects and blood biochemical alterations in occupationally exposed individuals in Punjab, Pakistan. Science of The Total Environment. 655<sup>o</sup> Volume. pp. 102–111. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.175>
- Hoffman, D. J., Rattner, B. A., G. Allen Burtor, J., & Jonhn Cairns, J. (2003). *HandBook of Ecotoxicology*. 2<sup>o</sup>Volume. Lewis Publishers.
- Hungria, M., Franchini, J., Brandão-Junior, O., Kaschuk, G., Souza, R. (2009). *Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil- tillage and two crop-rotation systems*. Applied Soil Ecology. 42<sup>o</sup> Volume. pp. 288-296.
- INETI (Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação) (2008). *Lista de Termos Hidrogeológicos*. Obtido em 27 de janeiro de 2019, de [http://e-geo.ineti.pt/bds/lexico\\_hidro/lista\\_termos.aspx](http://e-geo.ineti.pt/bds/lexico_hidro/lista_termos.aspx).
- INIAP (Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas) - Laboratório químico Agrícola Rebelo da Silva. (2006). Manual de Fertilização das Culturas. INIAP. ISBN-13: 978-989-95131-0-5.
- ISO 11348-2. (1998). *International Standard for Water Quality: Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fisherie (luminescent bacteria test). Part 2: method using liquid-dried bacteria*. International Organization for Standardisation. Geneve, Switzerland.

- ISO11348-3. (1998). *International Standard for Water Quality: Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (luminescent bacteria test). Part 3: method using freeze-dried bacteria*. Geneve: International Organization for Standardisation.
- ISO 11466 (1995). *Soil Quality - Extraction of Trace Elements Soluble in Aqua Regia*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO/ DIS 8692. (2002). *International Standard for Water Quality: Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae*. International Organization for Standardisation. Geneve, Switzerland.
- Jordan, D., Kremer, R., Bergfield, W., Kim, K., Cacnio, V. (1995). *Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields*. Biology and Fertility of Soils, Heidelberg. 19<sup>o</sup> Volume. pp.297-302.
- Kandeler, E., Gerber, H.(1988). *Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium*. Biol. Fert. Soils, 6<sup>o</sup> Volume. pp.68-72.
- Klaassen, C.D. (2001). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6<sup>th</sup> edition. C.D. Klaassen, ed. McGraw-Hill.
- Kleffmann, B. 2012. *Compactação de solo por pisoteio animal*. Obtido em setembro de 2019. <http://www.portalklff.com.br/publicacao/oldlink-1051>.
- Köck-Schulmeyer, M., Olmos, M., López, M., Barceló, D. (2013). *Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography electrospray-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr. 1305<sup>o</sup> Volume. pp. 176–187.
- Kumar, A., Vashist, M., Rathee, R. (2014). *Maternal Factors and Risk of Childhood Leukemia*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 15<sup>o</sup> Volume. pp. 781–784. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.2.781>.
- Latif, M., Licek, E. (2004). *Toxicity assessment of wastewaters, river waters, and sediments in Austria using cost-effective microbiotests*. Environ Toxicol. 19<sup>o</sup> Volume. pp. 302- 309.

- Lemos, R., Santos, R. (1996). *Manual de descrição e coleta de solo no campo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 3<sup>ed</sup>. Campinas-SP. pp. 83.
- Lepsch, I. (2002). *Formação e conservação dos solos*. Uberlândia: Oficina dos textos. pp. 178.
- Linde, C.D. (1994). *Physico-Chemical Properties and Environmental Fate of Pesticides*. Environmental Hazards Assessment Program. Sacramento, Califórnia. pp. 53.
- Lisboa, B., Vargas, L., Silveira, A., Martins, A., Selbach, P. (2012). *Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes manejos*. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 36<sup>o</sup> Volume. pp. 45-55.
- Marques, C., Carvalho, M. (2017). *A agricultura e os sistemas de produção do alentejo: Breve caracterização da sua evolução, situação actual e perspectivas*. Revista de Economia e Agronegócio - REA. pp. 15-52.
- Martins, J. C., Fernandes, R. (maio de 2017). *Processos de degradação do solo- medidas de prevenção*. Obtido em outubro de 2019, de Vida Rural: <https://www.vidarural.pt/wp-content/uploads/sites/5/2017/07/aqui-1.pdf>
- Matsuoka, M., Mendes, I., Loureiro, M. (2003). *Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT)*. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 27<sup>o</sup> Volume. pp. 425-433.
- Matsuoka, M. (2006). *Atributos biológicos de solo cultivados com videira na região da Serra Gaúcha*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Melo, W., Melo, G., Araújo, A., Melo, V. (2010). *Avaliação da atividade enzimática. Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo Vermelho-Escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado*. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 27<sup>o</sup> Volume. pp. 435-443.
- Mendes, I., Vivaldi, L. (2001). *Dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob Mata de Galeria na região do Distrito Federal*. In: Ribeiro, J.F.; Fonseca, C.L.; Souza-Silva, J.C. (eds.). Cerrado: Caracterização e recuperação de matas de galeria. Planaltina: Embrapa Cerrados.



- Mendes, C., Souza, V.; Resck, S., Gomes. (2003). *Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo Vermelho-Escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado*. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 27º Volume. pp. 435-443.
- Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S. M., Silva, L., Cunha, M.A., Leitão, S., Moura, I., Cortez, C., Brito, F. (2009). *Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal*. J Hazard Mater. 163º Volume. pp. 665-670.
- Mesnage, R., Biserni, M., Genkova, D., Wesolowski, L. & Antoniou, M.N. (2018). *Evaluation of neonicotinoid insecticides for oestrogenic, thyroidogenic and adipogenic activity reveals imidacloprid causes lipid accumulation*. Journal of Applied Toxicology. 38(12) Volume. pp.1483–1491. <https://doi.org/10.1002/jat.3651>.
- Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. (1990). *Proteção fitossanitária das culturas. In: Um guia para o agricultor. Apoios técnicos para o desenvolvimento da agricultura*. Direção-Geral de Planeamento e Agricultura. Lisboa. 2º Volume. pp.216-263.
- Monreal, C., Bergstrom, D. (2000). *Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality*. Canadian Journal of Soil Science, Ottawa. 80º Volume. pp.419-428.
- Morales, J. (1993). *Sedimentologia del Estu rio del Guadiana (SW España–Portugal)*. (PhD thesis). University of Sevilla, Spain.
- Moreira, F., Siqueira, J. (2006). *Microbiologia e bioqu mica do solo*. 2º ed. Lavras: Editora UFLA. pp.729.
- OCDE (Organization for Economic Cooperation and Development). (2002). *Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test*. OCDE 201. Paris.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004). *Mutagens in surface waters: a review*. Mutat. Res. 567º Volume. pp. 109-149.
- Palma, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R. (2008). *Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to Vibrio fischeri, Thamnocephalus platyurus and Daphnia magna, Relative to Their Concentrations in*

- Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 81° Volume. pp. 485-489.
- Palma, P. A. (2009). *Estudo de Pesticidas com Características de Desregulação Endócrina Quantificados na Albufeira do Alqueva*. Coimbra.
- Palma, P., Palma, V., Matos, C., Fernandes, R., Bohn, A., Soares, A., & Barbosa, I. (2009). *Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of Daphnia magna*. *Chemosphere*. pp. 676-681.
- Palma, P., Köck-Schulmeyer, M., Alvarenga, P., Ledo, L., Barbosa, I., López de Alda, M., & Barceló, D. (2014c). *Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal)*. pp. 488-489, 208-209.
- Palma, P., Ledo, L., & Alvarenga, P. (2015a). *Assessment of trace element pollution and its environmental risk to freshwater sediments influenced by anthropogenic contributions: The case study of Alqueva reservoir (Guadiana Basin)*. *Obtido de Catena*. pp. 128, 174–184.
- Palma, P., Köck-Schulmeyer, M., Alvarenga, P., Ledo, L., López de Alda, M., & Barceló, D. (2015b). *Occurrence and potential risk of currently used pesticides in sediments of the Alqueva reservoir (Guadiana Basin)*. *Obtido de Environmental Science and Pollution Research*. 22° Volume. pp. 7665-7675.
- Palma, P., Adriana Catarino, C. M., Martins, I., Tomaz, A., Dôres, J., Patanita, M., & Alvarenga, P. (2019). *Estudo do efeito das práticas agrícolas nas características de solos do aproveitamento hidroagrícola Brinches-Enxoé (Subsistema Ardila, Alqueva)*. *Encontro Anual das Ciências do Solo de 2019*.
- Peixoto, S., Chaer, M., Franco, N., Reis Junior, B., Mendes, C., Rosado, S. (2010). *A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 98° Volume. pp. 403-413.
- Pereira, T. (2003). *Impacte da utilização de pesticidas em ecossistemas orizícolas sobre a qualidade de águas superficiais*. *Dissertação de Doutoramento Eng. Agronómica*. ISA, UTL, Lisboa. pp. 394.

- Pimenta, S. P. (2014). *A agricultura da região alentejo nos últimos 25 anos e perspetivas no quadro da PAC pós 2013*. Évora: Universidade de Évora.
- Pinto, C., Aicep, D., Aicep, D., Cossec, D., AICEP, D. P., Andrade, G. S., San, L. C. (junho de 2017). Indicadores Positivos na Agricultura Portuguesa. *Revista Portugalglobal*, 7. Obtido em janeiro de 2020, de Portugalglobal: [http://portugalglobal.pt/PT/RevistaPortugalglobal/2017/Documents/Portugalglobal\\_n99.pdf](http://portugalglobal.pt/PT/RevistaPortugalglobal/2017/Documents/Portugalglobal_n99.pdf)
- PRoSolos (2015). *Projeto legislativo relativo Prevenção da Contaminação e Remediação dos Solo (PRoSolos)*. Obtido em maio de 2019, de PRoSolos: <https://participa.pt/pt/consulta/prosolos-5415>
- Powlson, D., Prookes, P., Christensen, B. (1987). *Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation*. Soil Biology and Biochemistry. 19º Volume. pp. 159-164.
- Requena, M., Parrón, T., Navarro, A., García, J., Ventura, M., Hernández, A., Alarcón, R. (2018). Association between environmental exposure to pesticides and epilepsy. *NeuroToxicology*. 68º Volume. pp. 13–18. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2018.07.002>
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., Pennock, D., (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global Soil Partnership. Soil pollution: a hidden reality
- Salazar, S., Sánchez, L., Alvarez, J., Valverde, A., Galindo, P., Igual, J., Peix, A., Santa-Regina, I. (2011). *Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices*. Ecological Engineering, Salamanca. 37º Volume. pp. 1123-1131.
- Santos, J. Q. (2015). *Fertilização- Fundamentos Agroambientais da utilização dos Adubos e Corretivos*. Publindústria.
- Schmitz, J. (2003). *Indicadores biológicos de qualidade do solo*. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. pp. 234.
- Seybold, C., Herrick, J., Bredja, J. (1998). *Soil resilience: a fundamental component of soil quality*. Soil Science, Madison. 164º Volume. pp. 224-233.

- Silva, C. S. (2012). *Utilização de Ensaios Ecotoxicológicos na Avaliação de Risco Ambiental Promovido por Pesticidas: caso-estudo Brejo do Cagarrão*. Obtido em 10 de setembro de 2019, de <https://repositorio.ipbeja.pt/bitstream/20.500.12207/147/6/CI%C3%A1ludia%20Sofia%20Ludovino%20Matos%20Silva%20-%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20ensaios%20ecotoxicologicos%20na%20avalia%C3%A7ao%20de%20risco%20ambiental%20promovido%20por%20pesticidas%20-%202012>
- Silva, D., Pompêo, M., Paiva, T. (2015). *Ecotoxicologia no Contexto Atual no Brasil*. In: Pompêo, M., Moschini-Carlos, V., Nishimura, P., Silva, S., Doval, J. (Org.). *Ecologia de Reservatórios e Interfaces*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. pp. 340-353.
- Simões, J. S. (2005). *Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na agricultura*. (S. P. Inovação, Ed.) Obtido em outubro de 2019, de [http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/utilizacao\\_fitofarmacêuticos\\_agricultura.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/utilizacao_fitofarmacêuticos_agricultura.pdf)
- Soares, A. (1989). *Clonal variation in life-history traits in Daphnia magna Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for ecotoxicology*. Tese de Doutoramento. Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield. pp. 162.
- Sokal, R., Rohlf, F. (1995). *Biometry - The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (3ª ed.), W.H. Freeman and Company. New York.
- SROA - Serviço de Reconhecimento e Ordenamento Agrário. (1961). *Carta de Solos de Portugal*.
- Stein, J. (1973). *Handbook of Phycological Methods, culture methods and growth measurements*. London: Cambridge University Press.
- Tabatabai, M.A., (1994). Soil enzymes. In: Mickelson, S.H., Bigham, J.M. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. pp. 775– 833
- Tejada, M., Hernandez, M., Garcia, C. (2006). *Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effects on the Soil Biological Properties*. J. Environ. Qual. 35º Volume. pp. 1010 – 1017.

- Yang, L. et al., (2008). *Fertilization regulates soil enzymatic activity and fertility dynamics in a cucumber field*. Scientia Horticulture. 116º Volume. pp. 21–26.
- Varennnes, A. d. (2003). *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Lisboa: Escolar Editora.
- Vasconcellos, R. (2012). Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de restauração ambiental. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. pp.113.
- Veres, Z., Kotroczó, Z., Fekete, I., Tóth, J., Lajtha, K., Townsend, K., Tóthmérész, B. (2015). *Soil extracellular enzyme activities are sensitive indicators of detrital inputs and carbon availability*. Applied Soil Ecology. 92º Volume. pp. 18-23.
- Vighi, M., Di Guardo, A. (1995). *Predictive approaches for the evaluation of pesticide exposure*. In: M. Vighi, E. Funari (Ed.)- *Pesticide risk in groundwater*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 3-34.
- Walkley, A., Black, I. A. (1934). *An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method*. Soil Science, Baltimore. 37º Volume. pp. 29-38.
- Weil, R., Brady, N. (2017). *The Nature and Properties of Soils*. 15º Ed. Global Edition. Harlow.
- Wild, A. (1993). *Soil and Environment: An Introduction*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wharfe, J., Adams, W., Apitz, S., Barra, R., Bridges, T., Hickey, C. Ireland S. (2007). *In situ methods of measurement—an important line of evidence in the environmental risk framework*. Integrated Environmental Assessment and Management. 3º Volume. pp. 268–274.
- Withford, D., Mason, L., Winter, C. (2007). *Pesticides and food safety*. Purdue University Cooperative Extension Service. West Lafayette, EUA. pp.12.
- WHO. (2013). *Ten chemicals of major health concern*. Obtido em abril de 2019, de WHO: [www.who.int/ipcs/assessment/public\\_health/chemicals\\_phc/en/index.html](http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/index.html).
- Zagatto, P., Bertoletti, E. (2008) *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa.

Zar, J. (1996). *Biostatistical analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.